UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie

Année 1968 • Thèse n° 565

Contrôle de Médicaments à base de Vitamines B_1 B_6 et B_{12} : Intérêt des Méthodes Automatiques

Thèse pour le Doctorat de l'Université
(Mention Pharmacie)
présentée et soutenue publiquement
le Vendredi 20 Décembre 1968

par Daniel GRENIÉ
né le 27 Novembre 1941 à BORDEAUX (Gironde)

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

MM R. CROCKETT, Professeur . . . . . Président

P. MESNARD, Professeur . . . . . }
H. LAUBIE, Professeur . . . . . } Juges
R. GOLSE, Professeur . . . . . }
J. MARQUEVIELLE, Professeur . . . . . }

Éditions Bergeret, 2, rue Bergeret - BORDEAUX
— Tél: 91-12-59 —

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543917_0011

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYENS HONORAIRES : MM. G. PORTMANN, R. SIGALAS.
DOYEN : M. F. TAYEAU. — ASSESSEURS : MM. P. LAUMONIER, N...

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. A. MANDOUL, CHARRIER, DUBREUIL, CREYX, DARGET, R. SIGALAS, G. PORTMANN, M. RIVIÈRE, B. GIRARD, C. PIFFAULT, R. FABRE, R. DUFOUR, P. FOURMENT, E. AUBERTIN, X. J. DUBECQ, L. MASSÉ, A. LACHAPÈLE, R. DE GRAILLY, G. VITTE.

PROFESSEURS TITULAIRES

MM.	
N.....	Pharmacie chimique et pharmacodynamie.
P. DELMAS MARSALET....	Clinique des maladies nerveuses et mentales.
P. DERVILLÉE.....	Médecine légale et Médecine du travail.
R. MANDOUL.....	Zoologie et parasitologie.
R. CASTAGNOU.....	Toxicologie et hygiène appliquée.
J. REBOUL.....	Carcinologie.
P. MESNARD.....	Chimie organique et Chimie analytique.
R. GRANDPIERRE.....	Physiologie.
P. BROUSTET.....	Clinique médicale cardiologique.
J. MAGENDIE.....	Clinique chirurgicale.
F. TAYEAU.....	Biochimie médicale A.
G. MAYER.....	Histologie et embryologie.
P. BLANQUET.....	Physique nucléaire appliquée et radiobiologie.
N.....	Pathologie générale et expérimentale.
R. SARIC.....	Clinique médicale.
L. POUYANNE.....	Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique.
J.-J. DUBARRY.....	Hydro-climatologie thérapeutique et clinique des maladies de l'appareil digestif.
F.-J. TRAISSAC.....	Clinique thérapeutique.
R. MAHON.....	Clinique d'accouchements.
R. PAUTRIZEL.....	Immunologie et biologie parasitaire.
Mlle G. ROUGIER.....	Biologie appliquée à l'éducation physique et aux sports.
G. MOUSTARDIER.....	Bactériologie.
E. BESSIÈRE.....	Clinique ophtalmologique.
H. LEGER.....	Anatomie pathologique.
J. MASQUELIER.....	Matière médicale.
G. MORETTI.....	Clinique médicale propédeutique et médecine tropicale.
J. DESPONS.....	Clinique d'oto-rhino-laryngologie.
P. LAUMONIER.....	Clinique chirurgicale pleuro-pulmonaire.
J. LENG-LÉVY.....	Clinique médicale et des maladies infectieuses.
R. LETAC.....	Pathologie et recherche chirurgicales.
R. QUILICHINI.....	Pharmacie galénique.
E. NEUZIL.....	Biochimie médicale B
R. STOLL.....	Biologie.
J. LANGE.....	Clinique urologique.
P. FRÉOUR.....	Hygiène et Clinique de pneumophtisiologie.
F. RIGAUD.....	Anatomie.
J. FAURE.....	Physio-pathologie et neuro-physiologie.
G. DUBOURG.....	Clinique chirurgicale des maladies cardiaques.
J. VILLAR.....	Clinique gynécologique.
P. LE COULANT.....	Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.
M. BERGOUIGNAN.....	Pathologie nerveuse et mentale.
J. DUHAMEL.....	Physique médicale et pharmaceutique.
N.....	Sémiologie médicale.
H. CHOUSSAT.....	Pathologie médicale.
L. CHASTRUSSE.....	Clinique obstétricale.
P. VERGER.....	Clinique médicale des maladies des enfants.
F. LAPORTE.....	Chirurgie générale.
R. TINGAUD.....	Clinique chirurgicale.
N.....	Sémiologie chirurgicale.
H. LAUBIE.....	Botanique et cryptogamie.
Cl. RICHIR.....	Anatomie pathologique.
R. GOLSE.....	Chimie générale et Chimie minérale.
J. BAILENGER.....	Zoologie et biologie animale.
J.-Cl. COLLETER.....	Chimie analytique.
H. BRICAUD.....	Médecine générale.
P. BENOIT.....	Clinique odonto-stomatologique.
Cl. MARTIN-DUPONT.....	Clinique néphrologique
J. CANELLAS.....	Pharmacodynamie et hydrologie.
G. DELORME.....	Electroradiologie.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM.	
R. CANIVENC.....	Histologie.
J. RIVIÈRE.....	Médecine générale.
J. DAVID-CHAUSSÉ.....	Médecine générale.
J. MARQUEVIELLE.....	Biochimie médicale.
H. DULONG DE ROSNAY...	Bactériologie.
M. BLANC.....	Neuro-psychiatrie.
Cl. MASSÉ.....	Chirurgie générale.
R. MARAUD.....	Histologie et embryologie.
P. DE PASQUIER.....	Bactériologie.
J. STAEFFEN.....	Médecine générale.
J.-P. DUBECQ.....	Obstétrique.
R. CROCKETT.....	Chimie organique et chimie analytique.
G. NEVERRE.....	Physiologie.
A. SERISÉ.....	Hygiène.

MAITRES DE CONFERENCES AGRÉGÉS :

MM.	
J. MEUNIER	Histologie.
P. FERRET-BOUIN	Physique médicale.
R. JENSEN	Chimie biologique.
J. VIDEAU	Anatomie.
J. BROUSSIN	Electroradiologie.
A. CASTAING	Médecine générale et thérapeutique.
R. TESSIER	Pneumo-phtisiologie.
Mme J. SÉCHET	Biochimie médicale.
C. LAGARDE	Carcinologie.
C. BÉRAUD	Thérapeutique.
H. LAZARINI	Médecine légale et Médecine du travail.
J. SOUMIREU-MOURAT	Obstétrique.
G. CABANIEU	Médecine générale.
R. LE LOURD	Pneumo-phtisiologie.
L. COURAUD	Chirurgie générale.
J. BENTÉGEAT	Hématologie.
Cl. VRIGNAUD	Physique pharmaceutique.
M. BERGER	Oto-rhino-laryngologie.
P. SOURREIL	Dermato-vénéréologie.
L. ARNÉ	Médecine générale et thérapeutique.
Cl. MARTIN	Pédiatrie.
R. BAUTE	Cryptogamie.
V. DARGELOS	Microbiologie.
Mlle S. LARCEBAU	Toxicologie.
C. WONÉ	Médecine générale et thérapeutique.
J. JULIEN	Médecine générale et thérapeutique.
J.-J. BATTIN	Pédiatrie.
M. DALLOCCHIO	Cardiologie et maladies vasculaires.
J. AUBERTIN	Maladies infectieuses.
P. VÉRIN	Ophtalmologie.
M. GOT	Neuro-chirurgie.
J. TAVERNIER	Electroradiologie : diagnostic et thérapeutique.
J. VINCENT	Physiologie et explorations fonctionnelles.
L. CHEVAIS	Anesthésiologie.
G. GILLARDEAU	Anesthésiologie.
J. HONTON	Orthopédie et traumatologie.
M. BOMBART	Orthopédie et traumatologie.
A. HUGUES	Cancérologie.
M. SABATHIÉ	Anesthésiologie.

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

MM.	
J. DEPAULIS	Chirurgie générale.
P. DARMAILLACQ	Chirurgie générale.
L. CORCELLE	Ophtalmologie.
M. PORTMANN	Oto-rhino-laryngologie.
P. BLANCHOT	Médecine générale.
L. DOUTRE	Chirurgie générale.
F. BALLANGER	Urologie.
P. BIRBIS	Chirurgie générale.
J.-P. CALAMEL	Chirurgie générale.
L. TEXIER	Dermato-syphiligraphie.
H. POUYANNE	Neuro-chirurgie.

AGRÉGÉS LIBRES

MM.	
G. FAUGÈRE	Obstétrique.
M. L'ÉPÉE	Médecine légale.
H. CABANIÉ	Anatomie.

CHARGÉS DES FONCTIONS DE MAITRE DE CONFÉRENCES :

MM.	
P. BONJEAN	Anatomie.
M. LAHOURCADE	Parasitologie.
M. SENTENAC	Anatomie.
G. DELMON	Anatomie pathologique.
J. TRIBOULEY	Immunologie, sérologie.
F.-X. MICHELET	Stomatologie.

L'Attaché d'administration universitaire, chef des Services administratifs :

Mme M. C. CHAPENOIRE.

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation, ni improbation.

Contrôle de Médicaments à base de Vitamines B_1 B_6 et B_{12} : Intérêt des Méthodes Automatiques

---

Daniel GRENIÉ

PHARMACIEN

Assistant de Chimie à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux

Interne et Lauréat (Médaille d'Or) des Hôpitaux de Bordeaux

C. E. S. Chimie organique

C. E. S. Immunologie Générale et Appliquée

A MA FEMME ET A MES FILLES

Avec toute ma tendresse.

A MA MERE ET A LA MEMOIRE DE MON PERE

Ce travail n'est qu'une modeste preuve de ma reconnaissance et de mon affection.

A MES SOEURS ET A MON FRERE

Avec mes affectueuses pensées.

A MES BELLES-SOEURS ET A MES BEAUX-FRERES

En témoignage de mon affection à leur égard.

A TOUTE MA FAMILLE

Aux Membres du Laboratoire de Biochimie du Groupe
Pellegrin-Tondu et du laboratoire de Cardiologie

Une preuve de mon attachement.

Aux Membres du Laboratoire de Chimie Organique et
Chimie Analytique

Avec toute ma sympathie.

Il nous est particulièrement agréable de pouvoir exprimer nos remerciements à toutes les personnes qui ont apporté leur collaboration à ce travail :

Monsieur MARZAT,

dont les divers conseils nous furent très précieux.

Madame BOVIO, Aide Technique,

qui nous a apporté son concours très efficace dans la réalisation de nombreuses expérimentations.

Madame LAGARDERE, Secrétaire,

qui par son dévouement et son amabilité, a pris une part active dans la réalisation de ce travail.

A NOS MAITRES DE L'UNITE DE RECHERCHES DE CARDIOLOGIE

Monsieur le Professeur P. BROUSTET

Professeur de Clinique Médicale Cardiologique
Médecin des Hôpitaux, Chef de Service
Chevalier de la Légion d'honneur
Commandeur des Palmes académiques

Sous votre bienveillante autorité, nous avons compris l'exacte signification de l'expression "Unité" de Recherches. Nous vous prions de trouver ici l'expression de notre déférente admiration et de notre profonde gratitude.

Monsieur le Professeur H. BRICAUD

Professeur de Médecine Générale (Cardiologie)
Médecin des Hôpitaux, Chef de Service
Officier des Palmes académiques

La rigueur et la richesse de votre esprit de chercheur, la confiance que vous manifestez à notre égard, rendent passionnant le stade d'Internat que nous effectuons dans votre Service. Nous vous assurons de notre profond attachement.

A NOS JUGES

Notre Maître, Monsieur le Professeur P. MESNARD

Professeur de Chimie Organique et Chimie Analytique
Membre Correspondant de l'Académie de Pharmacie
Docteur ès Sciences
Inspecteur Principal des Pharmacies
Chevalier de la Légion d'honneur
Officier de l'Ordre National du Mérite
Officier des Palmes académiques
Officier de la Santé Publique
Membre Correspondant de la Real Academia de Farmacia de Madrid et de l'Institut de Coîmbra
Membre d'Honneur de la Société de Pharmacie de Bénarès (Inde)

Vous nous faites l'honneur de nous compter parmi vos proches collaborateurs. Après avoir bénéficié de la richesse de votre enseignement, nous profitons chaque jour davantage de l'étendue de vos connaissances.
Nous vous remercions de la confiance que vous nous avez accordée en nous suggérant un sujet d'actualité pour cette thèse.

Nous avons toujours trouvé auprès de vous l'aide et le réconfort qui permet à l'élève de surmonter les inévitables difficultés de son travail.

Permettez-nous de vous exprimer notre respectueux attachement, et notre très profonde reconnaissance.

A NOS JUGES (suite)

Monsieur le Professeur H. LAUBIE

Professeur de Botanique et de Cryptogamie
Docteur ès Sciences
Pharmacien des Hôpitaux
Officier des Palmes académiques

Nous avons été très sensible à la compréhension que nous avons toujours trouvée auprès de vous. Nous avons largement profité, lors de notre stage d'Internat à la Pharmacie de l'Hôpital Pellegrin de la richesse de vos connaissances et plus particulièrement de vos qualités d'analyste.

Veuillez trouver ici l'expression de notre vive gratitude.

Monsieur le Professeur R. GOLSE

Professeur de Chimie Générale et Minérale
Docteur ès Sciences
Pharmacien des Hôpitaux
Officier des Palmes académiques

Vous nous avez toujours manifesté la plus grande bienveillance durant nos études et pendant la réalisation de ce travail. Vous nous en donnez une nouvelle preuve en acceptant de siéger parmi nos juges. Nous vous exprimons notre respectueuse considération.

A NOS JUGES (suite)

Monsieur le Professeur J. MARQUEVIELLE

Professeur sans Chaire (Biochimie Médicale)
Biologiste des Hôpitaux
Docteur ès Sciences
Chevalier des Palmes académiques

Nous avons été très sensible à l'accueil bienveillant et à la compréhension que vous nous avez toujours montrés au cours des deux années d'Internat passées dans le Laboratoire de Biochimie du Groupe Pellegrin-Tondu. Nous y avons trouvé un matériel complémentaire précieux.

Nous vous assurons de notre très vive reconnaissance.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur R. CROCKETT

Professeur sans Chaire (Chimie Organique et Chimie Analytique)
Licencié ès Sciences
Assistant de Biochimie des Hôpitaux de Bordeaux

Cinq ans d'une étroite collaboration ne nous ont pas encore révélé toutes les facettes qui font de vous un véritable "Patron", un enseignant de qualité et un chercheur exceptionnel, tout à fait dans la ligne de celui qui est notre maître commun. La rigueur de votre enseignement, le caractère méticuleux de vos recherches et la manière d'encadrer vos élèves ne sont que le reflet d'un souci permanent d'exactitude et d'honnêteté, tant sur le plan scientifique que sur le plan humain.

Vous nous avez offert sans compter,votre temps et vos efforts pour nous prodiguer les conseils et les encouragements nécessaires à la réalisation de ce travail. Nous voudrions continuer à mériter l'affectueuse confiance que vous nous avez toujours accordée à l'Hôpital et à la Faculté. Pour tout cela, soyez assuré de notre indéfectible attachement et de notre profonde reconnaissance.

CONTROLE DE MEDICAMENTS

A BASE DE VITAMINES B_1, B_6 ET B_{12} :

INTERET DES METHODES AUTOMATIQUES

Travail du Laboratoire
de Chimie Organique et Chimie Analytique
de la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie
de Bordeaux

INTRODUCTION

°°°

Dans le cadre du contrôle physico-chimique des médicaments, de nombreux problèmes se posent à l'analyste en raison d'une part du nombre toujours croissant des spécialités pharmaceutiques, et d'autre part de la complexité des associations médicamenteuses fructueuses qu'elles renferment . Les vitamines en général et celles du groupe B en particulier n'échappent pas à cette constatation .

Depuis quelques années, les problèmes concernant la synthèse de ces vitamines et la préparation des médicaments qui les contiennent sont résolus . Au contraire, malgré les nombreuses méthodes de dosage déjà proposées, il nous a semblé intéressant de s'attacher à la mise sur pied de techniques plus facilement réalisables et d'une meilleure spécificité . C'est dans ce sens d'ailleurs, que travaillent de nombreux laboratoires analytiques d'Université et d'Industrie .

Les premières analyses de vitamines furent réalisées par des méthodes biologiques : les effets spécifiques de ces substances sur des animaux d'expérience , permettent en effet d'évaluer quantitativement leur concentration . Dans certains cas particuliers, ces méthodes restent utilisées, mais la plupart du temps elles sont remplacées par d'autres techniques, qui présentent sur ces méthodes l'avantage d'une plus grande simplicité et d'un moindre prix de revient . Il en est de même des méthodes chimiques comme la titrimétrie en milieu non aqueux dont la simplicité n'est pas en cause, mais qui manquent par trop de spécificité .

Au cours des vingt dernières années, méthodes biologiques et chimiques ont donc cédé le pas, chaque jour davantage aux méthodes physico-chimiques . Ces dernières sont en général plus rapides et plus simples . Cependant elles ne doivent être employées qu'avec certaines précautions nécessitant la connaissance très précise de leur valeur, notamment en ce qui concerne la sensibilité, la spécificité et la reproductibilité . On connaît actuellement des moyens pour augmenter le degré de spécificité de ces méthodes . Dans ce domaine, les techniques chromatographiques qui assurent une excellente séparation de chaque vitamine, se sont révélées d'une grande utilité : elles entrent fréquemment dans les protocoles de dosages physiques et physico-chimiques des vitamines du groupe B .

Essayer des techniques nouvelles, améliorer par une étude analytique des facteurs réactionnels des techniques déjà existantes, adapter chacune des techniques proposées au domaine de l'autoanalyse dans le contrôle du médicament, tels ont été les trois buts que nous nous sommes assigné dans ce travail .

Initialement intéressé par le contrôle de la vitamine B_6 , dans les formes médicamenteuses simples, nous avons été, par la suite, conduit à envisager le cas des associations polyvitaminées, en particulier les associations avec la thiamine et la cyanocobalamine .

En dehors des techniques microbiologiques (2) (53), et des dosages chimiques comme les méthodes de titration en milieu non aqueux (49) (64) (44), le dosage de la pyridoxine repose sur deux grands types de méthodes spectrophotométriques :

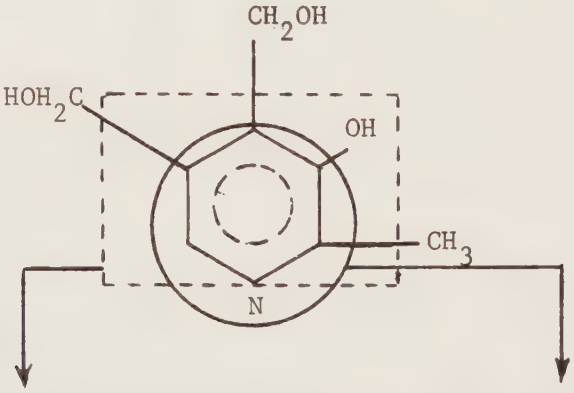
1°- des méthodes spectrophotocolorimétriques mettant en jeu une réaction chimique développant une coloration .

2°- la méthode par spectrophotométrie dans l'ultra-violet qui repose sur l'absorption propre de la molécule .

Le premier type de méthodes est basé généralement :

- soit sur la présence d'une fonction phénol non substituée en para .
- soit sur la structure pyridinique du noyau .

Quelques réactions classiques sont rappelées dans le tableau n°1 .



COLORIMETRIE

- *Réactions de formation de complexe :*
  - . *$FeCl_3$ (33)*
- *Réaction de réduction :*
  - . *Réactif phosphomolybdique de Folin (80) (50)*
- *Réaction de copulation avec :*
  - . *La 2-6 dichloroquinone-chlorimide (29) (30)*
  - . *La p. aminoacétophénone (13)*
  - . *La diéthyl p. phénylène diamine (77)*

FLUORO-METRIE

- . *L'acide sulfanilique diazoté (81) (59)*

- *Bromure de cyanogène (83)*

TABLEAU I

Une autre réaction un peu particulière est rapportée par STILLER et coll. (78) . Elle consiste en l'oxydation préalable de la vitamine en un dérivé 4-5 dicarboxylique, dont le couplage avec le résorcinol conduit à la phtaléine correspondante ; mais cette réaction n'est pas susceptible d'application quantitative .

A côté de ces différentes réactions, nous nous sommes intéressé à une réaction colorée utilisant l'acétate d'uranyle (51) . C'est son étude théorique et son application au dosage par voie manuelle et par voie automatique des médicaments simples qui feront l'objet de la première partie de ce travail .

L'étude théorique des différents facteurs de la réaction à la 2-6 dichloroquinone-chlorimide et l'application en voie manuelle et en voie automatique feront l'objet de la deuxième partie .

La troisième partie est consacrée à l'étude des différents spectres d'absorption des vitamines B_1 , B_6 et B_{12} en fonction du pH et à l'application de ces méthodes tant par voie manuelle que par autoanalyse aux dosages de ces principes dans les médicaments .

PREMIERE PARTIE

REACTION A L'ACETATE D'URANYLE

Cette réaction décrite par LAUBIE en 1949 (51), consiste en l'addition d'une solution aqueuse d'acétate d'uranyle à une solution aqueuse de vitamine B_6 : il se développe, dans ces conditions, une coloration jaune intense . La réaction ayant seulement fait l'objet d'un test qualitatif, nous avons effectué l'étude des différents facteurs pouvant intervenir dans son développement pour essayer de l'appliquer au dosage de la pyridoxine . L'étude expérimentale de cette réaction fait l'objet d'un premier chapitre ; le deuxième chapitre est consacré à son application au dosage dans les médicaments .

°°°

CHAPITRE I

ETUDE EXPERIMENTALE DE LA REACTION A L'ACETATE D'URANYLE

°°°

I - MATERIEL, REACTIFS, PROTOCOLE EXPERIMENTAL .

A / MATERIEL :

- Spectrophotomètre Unicam SP 500 et SP 800 .
- Bain-marie à température variable Lequeux .
- pH mètre thermostaté Quéré .

B / REACTIFS :

- Pyridoxine base
- Chlorhydrate de pyridoxine Touzart-Matignon
- Citrate mono-pyridoxinique
- Acétate de sodium Na CH_3 COO, 3 H_2O R. P.
- Acide acétique cristallisable R. P.
- Phosphate acide de potassium R. P.
- Réactif à l'acétate d'uranyle :

L'auteur préconisait l'emploi d'une solution aqueuse à 5% d'acétate d'uranyle . En opérant dans ces conditions, nous n'avons pas obtenu une solubilisation totale . C'est donc une solution saturée d'acétate d'uranyle dans l'eau distillée qui constitue le réactif (réactif I)

D'autre part, l'auteur pratiquant un test seulement qualitatif , opérait par addition de gouttes . Pour une application quantitative, nous avons réalisé des dilutions de ce réactif I permettant l'adjonction de volumes plus importants mesurables avec une meilleure précision .

Trois dilutions ont été réalisées :

- réactif II : dilution au 1/5 du réactif I
- réactif III : dilution au 1/2 du réactif I
- réactif IV : dilution au 3/4 du réactif I .

C / PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Arbitrairement, nous avons réalisé une réaction dans les conditions suivantes : dans deux tubes T_1 et T_2 on place successivement :

	T_1	T_2
Solution aqueuse de Pyridoxine base à 1 g °/oo	3 ml	0
Eau bi-distillée	0	3 ml
Réactif I, II, III ou IV	3 ml	3 ml

Après agitation et instantanément une coloration jaune se développe dans le tube à réaction T_1 . Le tube T_2 , légèrement coloré en jaune par le réactif lui-même, constitue le blanc, contre lequel est effectuée la mesure spectrophotométrique .

II - ETUDE EXPERIMENTALE PROPREMENT DITE

- Nous avons tout d'abord défini le spectre et les constantes d'absorption du produit coloré obtenu .

- Nous avons ensuite étudié, à la longueur d'onde d'absorption maxima, l'influence de différents facteurs (Temps, Température, pH) .

- Enfin, la vérification de la loi de Beer-Lambert nous a permis de préciser l'influence de la concentration du réactif sur la sensibilité de la réaction .

Les résultats sont rassemblés dans les figures suivantes :

- Figure 1 : A = f (λ) Spectre d'absorption
- Figure 2 : A = f (T) Facteur temps
- Figure 3 : A = f (θ °) Facteur température
- Figure 4 - 5 - 6 : A = f (pH) Facteur pH
- Figure 7 - 8 - 9 : A = f (C) Loi de Beer-Lambert .

III - DISCUSSION DES RESULTATS

1°- Spectre d'absorption (figure n°1)

- Sur le plan qualitatif, on note un maximum d'absorption situé à 440 mμ suivi d'une légère inflexion à 430 mμ

- Sur le plan quantitatif, il n'est pas possible de définir des coefficients d'extinction molaire pour un produit coloré qui ne se forme peut-être pas stoechiométriquement . D'autre part, comme nous aurons l'occasion de le revoir, la réaction est vraisemblablement une réaction de formation de complexe non totale : l'intensité de la réaction dépend en effet de la concentration en ions UO_2^{++} dans le milieu réactionnel .

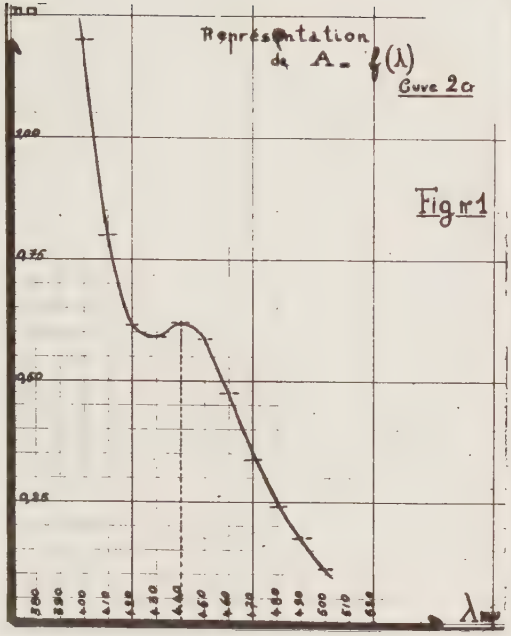


Figure n° 1 = A = f(λ) - Spectre d'absorption

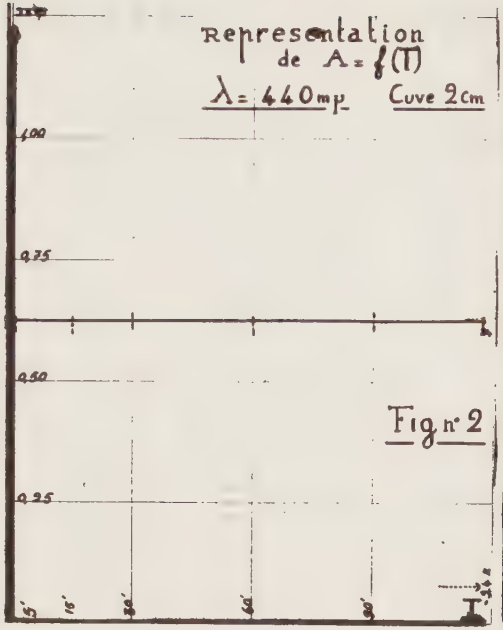


Figure n° 2 = A = f(T) - Facteur temps

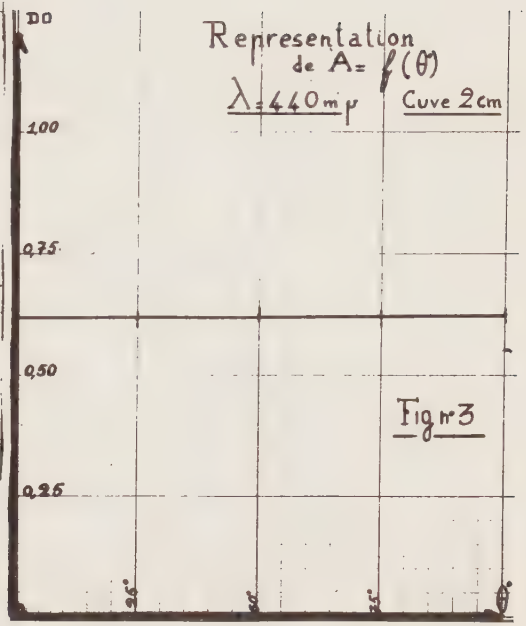


Figure n° 3 = A = f(θ°) - Facteur température

REACTION A L'ACETATE D'URANYLE

2°- Facteur temps (figure n°2)

Des mesures effectuées respectivement au bout de 1, 5, 15, 30, 60 minutes et 24 heures ne montrent ni différence quantitative, ni modification qualitative du spectre d'absorption . La réaction atteint instantanément son équilibre et demeure indéfiniment stable .

3°- Facteur température (figure n°3)

Des mesures effectuées après réaction respectivement à 0, 25, 50, 75, 100°C donnent des résultats absolument similaires aussi bien sur le plan qualitatif que sur le plan quantitatif .

4°- Facteur pH (figures n°4, 5, 6)

Cette étude a été réalisée dans la zone de pH comprise entre 2, 20 et 5, 80 . En effet au-delà de pH = 2, 20 la réaction ne se développe pratiquement plus ; au-delà de pH = 5, 80 , il y a précipitation du réactif à l'acétate d'uranyle .

Par ailleurs, cette étude a été réalisée avec deux systèmes tampons, présentant un gradient de pH de l'ordre de 0, 2 unité .

a) Système phtalate acide de potassium N/5 , HCl ou NaOH N/5 .

b) Système acide acétique M, acétate de sodium M.

La composition de ces deux systèmes tampons est indiquée dans les tableaux n° II et III . (pages suivantes) .

pH	Phtalate acide de potassium N/5	HCl N/5	NaOH N/5	Eau bi-distillée
2,2	50 ml	46,7		Q.S.P. 200 ml
2,4	" "	39,6		-- --
2,6	" "	32,95		-- --
2,8	" "	26,42		-- --
3	" "	20,32		-- --
3,2	" "	14,7		-- --
3,4	" "	9,90		-- --
3,6	" "	5,97		-- --
3,8	" "	2,63		-- --
4	" "		0,4	-- --
4,2	" "		3,7	-- --
4,4	" "		7,5	-- --
4,6	" "		12,15	-- --
4,8	" "		17,7	-- --
5	" "		23,85	-- --
5,2	" "		29,95	-- --
5,4	" "		35,45	-- --
5,6	" "		39,85	-- --
5,8	" "		43	-- --
6	" "		45,45	-- --
6,2	" "		47	-- --

TABLEAU II

Gradient de pH du tampon phtalate acide de potassium - HCl N/5 ou NaOH N/5

pH	ml d'acide acétique M	ml d'acétate de sodium M
3	97	3
3,65	95	5
3,85	90	10
4,05	85	15
4,15	80	20
4,30	75	25
4,42	70	30
4,48	65	35
4,55	60	40
4,65	55	45
4,75	50	50
4,82	45	55
4,90	40	60
5,00	35	65
5,08	30	70
5,18	25	75
5,32	20	80
5,45	15	85
5,65	10	90
5,95	5	95
6,10	4	96

TABLEAU III

Gradient de pH du tampon Acide acétique-Acétate de sodium

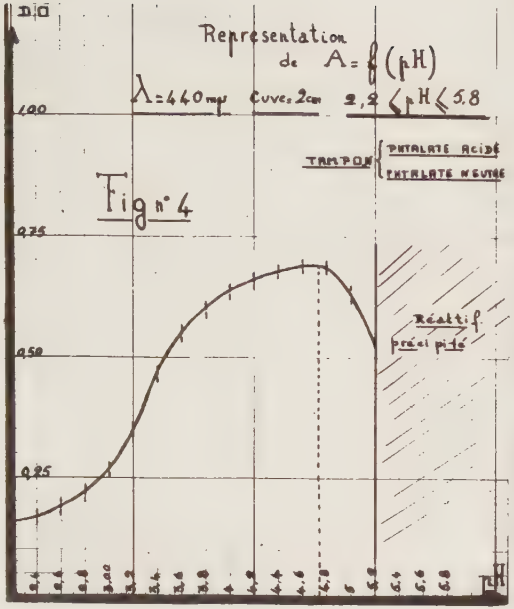


Figure n° 4 = A = f(pH) - Tampon phtalate acide - phtalate neutre de potassium

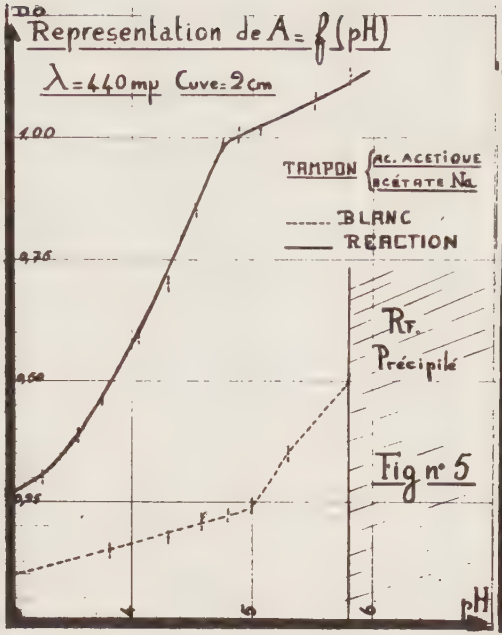


Figure n° 5 = A = f(pH) - Tampon acide acétique - acétate de sodium

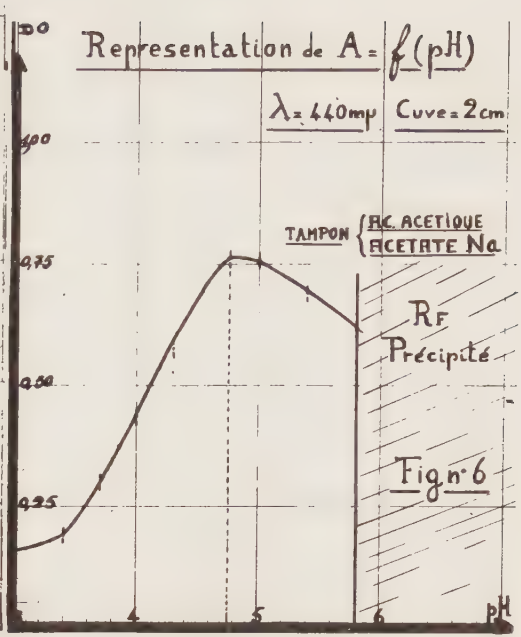


Figure n° 6 = A = f(pH) - Tampon acide acétique - acétate de sodium

REACTION A L'ACETATE D'URANYLE

a) Etude au moyen du système phtalate acide/ phtalate neutre de potassium .

Cette étude a été réalisée avec des réactifs obtenus par dilution du réactif I dans les diverses solutions tampons, le protocole d'expérimentation restant le même . Pour chaque pH, on effectue un blanc réactif avec le tampon correspondant à celui utilisé pour le dosage et on lit le dosage contre le blanc . La figure n°4 résume cette étude .

Elle montre que :

- la réaction colorée ne se développe pratiquement plus pour des pH inférieurs à 2 .

- le maximum d'intensité de la coloration est obtenu pour un tampon de pH = 4, 75 et diminue ensuite assez rapidement .

- pour un pH supérieur à 5, 30, le blanc réactif contre lequel est effectué la lecture précipite . Par contre, pour ce même pH , le tube à réaction ne présente pas de précipitation . Il y a donc un décalage de pH par rapport au blanc dans la précipitation du réactif à l'acétate d'uranyle .

Ce système tampon a l'inconvénient d'introduire dans la réaction des ions étrangers tels que les ions phtalates dont il est difficile de préciser le rôle .

b) Etude au moyen du système acide acétique/ acétate de Na .

Cette étude a été réalisée pour n'avoir dans le milieu que des ions $CH_3\ COO^-$, Na^+ et UO_2^{++} . Nous avons alors été conduits à utiliser comme réactif une dilution au 1/2 du réactif 1 et non une dilution au 1/10 comme précédemment . En effet, avec ce système tampon, le réactif au 1/10 donne une réaction colorée extrêmement faible : tout se passe comme si le tampon consommait des ions uranyles . En opérant avec un réactif plus concentré en ions uranyles (réactif dilué au 1/2) la réaction colorée se développe à nouveau normalement .

Chaque lecture est encore effectuée contre un blanc réalisé avec le tampon correspondant à celui utilisé pour le dosage .

Les figures n° 5 et 6 montrent que :

1- Nous retrouvons, comme dans le cas précédent, un maximum de sensibilité pour un pH = 4,75 ; ceci est intéressant pour deux raisons :

. Ce point est précisément le pKa de l'acide acétique et donc l'effet tampon y est maximum .

. D'autre part, la préparation d'une telle solution tampon est fort simple puisqu'elle se fait par mélange à parties égales de deux solutions molaires d'acide acétique et d'acétate de sodium .

2- Nous trouvons ici une zone de précipitation identique pour le blanc réactif et pour la réaction : pH supérieur à 5,80 .

3- A partir de pH = 5, le fond spectral est lui-même assez fortement coloré .

5°- Facteur photochimique

L'étude comparative de la réaction réalisée d'une part à la lumière, d'autre part à l'abri de la lumière conduit dans le premier cas à une précipitation du mélange réactionnel imputée par BAUR (6) d'une part à une réduction de UO_2^{++} en sels uraneux U^{++++} , d'autre part à une décarboxylation avec formation de divers produits gazeux (C_2H_6 , CH_4 , CO_2, CO et H_2) .

6°- Vérification de la loi de Beer-Lambert (figure n°7)

La figure n°7 résume cette vérification dans le cas de la pyridoxine base . Elle montre que la loi de Beer est vérifiée quelle que soit la concentration en ion uranyle du réactif utilisé (réactif I dilué au 1/10, 1/5 ,

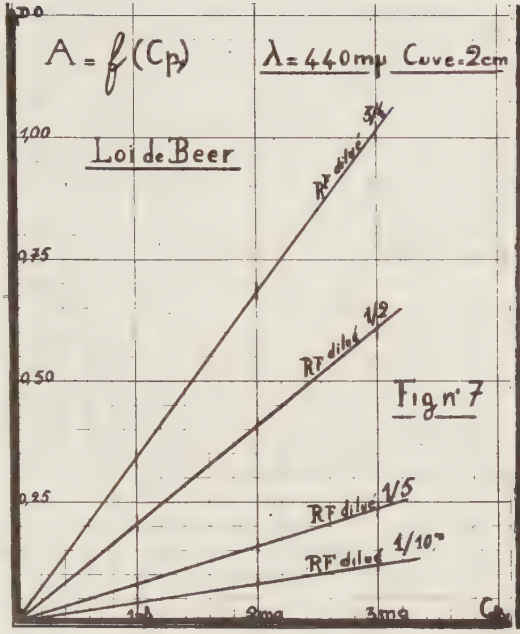


Figure n° 7 = Loi de BEER : Pyridoxine base

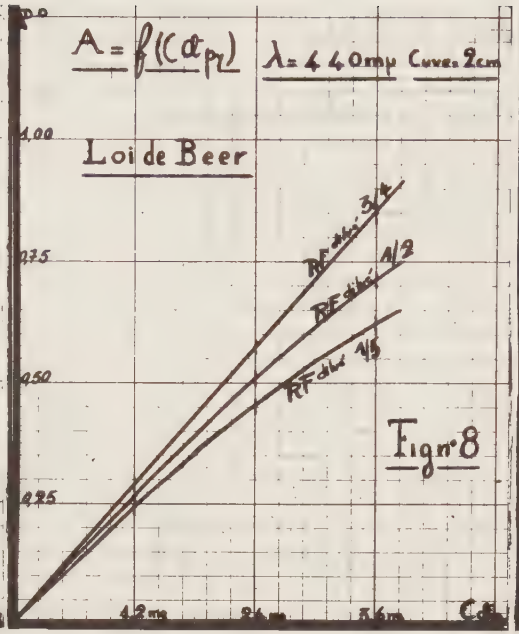


Figure n° 8 = Loi de BEER : Chlorhydrate de pyridoxine

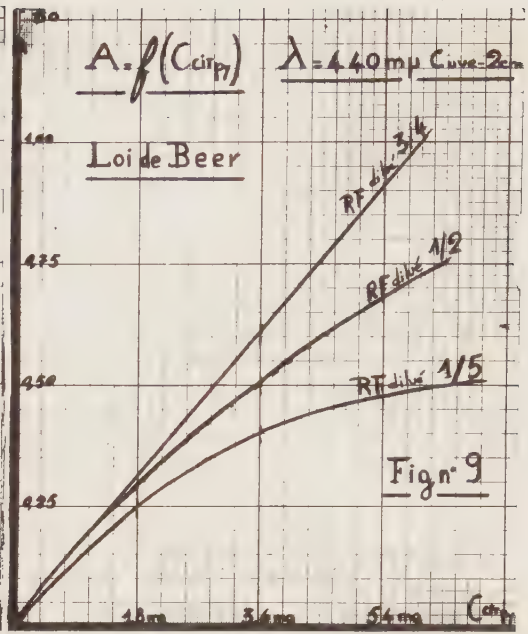


Figure n° 9 = Loi de BEER : Citrate monopyridoxinique

REACTION A L'ACETATE D'URANYLE

1/2, 3/4) . Le réactif I dilué au 1/2 conduit à la fois à une bonne sensibilité et à un blanc réactif faiblement coloré .

7°- Extension de la réaction au chlorhydrate de pyridoxine et au citrate monopyridoxinique .

Une étude analogue à celle effectuée avec la pyridoxine base a été réalisée pour ces deux composés . Les résultats obtenus sont identiques à ceux de l'étude précédente sauf en ce qui concerne le dernier point, c'est-à-dire la vérification de la loi de Beer .

Les figures n° 8 et 9 montrent en effet que cette loi n'est parfaitement vérifiée qu'avec le réactif I dilué au 3/4 ; le citrate donne des écarts par rapport à cette loi plus importants que ceux donnés par le chlorhydrate .

Avec le réactif dilué au 3/4, la sensibilité de la réaction (à concentration égale en pyridoxine base) est légèrement plus faible pour les sels que pour la base. Elle est du même ordre pour les deux sels .

8°- Mécanisme de la réaction - Structure du complexe coloré .

Pour le mécanisme réactionnel, nous pensons qu'il implique deux réactions d'équilibre possédant un ion commun, l'ion UO_2^{++} . En effet, lorsqu'on met en solution de l'acétate d'uranyle, on a un premier équilibre caractérisé par une constante d'équilibre Ka :

$$UO_2 (CH_3\ COO)_2 \underset{2}{\overset{1}{\rightleftharpoons}} UO_2^{++} + 2\ CH_3\ COO^- \qquad (a)$$

$$Ka = \frac{[UO_2]^{++}\ [CH_3\ COO^-]^2}{[UO_2\ (CH_3\ COO)_2]}$$

L'introduction de la pyridoxine entraîne vraisemblablement l'établissement d'un deuxième équilibre tendant à la formation d'un complexe Pyridoxine - UO_2^{++}, responsable de la réaction colorée du type :

$$\text{Pyridoxine} + UO_2^{++} \underset{2}{\overset{1}{\rightleftharpoons}} (\text{Pyridoxine} - UO_2^{++}) \qquad (b)$$

Ce deuxième équilibre est aussi caractérisé par une constante d'équilibre de type Kb :

$$Kb = \frac{\left[\text{Pyridoxine} - UO_2^{++}\right]}{\left[\text{Pyridoxine}\right] \cdot \left[UO_2^{++}\right]}$$

L'introduction de pyridoxine consomme des ions uranyles pour établir l'équilibre (b) ; il en résulte une diminution de UO_2^{++} , qui entraîne un déplacement compensateur de l'équilibre (a) dans le sens 1, c'est-à-dire une nouvelle dissociation de l'acétate d'uranyle .

Ces hypothèses sont concordantes avec les faits que nous avions constatés dans l'étude du facteur pH à l'aide du tampon acéto-acétique . Dans ce cas-là en effet, on introduit un ion participant à l'équilibre (a) , l'ion $CH_3\,COO^-$. Il en résulte une augmentation importante de sa concentration qui intervient au carré dans l'expression de Ka . Pour que Ka garde sa valeur constante , il faut donc que se produise une forte diminution de la concentration en UO_2^{++} . L'équilibre (a) doit donc subir un déplacement dans le sens 2 . Cette diminution de (UO_2^{++}) entraînera secondairement un déplacement de l'équilibre (b) dans le sens 2 favorisant donc la formation de UO_2^{++} et ceci par dissociation du complexe Pyridoxine - UO_2^{++} . Ceci explique que pour un même réactif dilué au 1/10, on obtienne une coloration moindre avec un tampon acétique qu'avec un tampon phtalate . Par contre,

en réalisant une dilution au 3/4 du réactif n°I dans le tampon acéto-acétique, nous introduisons, certes des ions $CH_3\ COO^-$, qui provoqueront les mêmes effets que précédemment , mais également des ions UO_2^{++} qui compenseront cet effet, sans que le complexe Pyridoxine UO_2^{++} ait besoin de se dissocier .

Quant à la structure proprement dite du produit coloré, la bibliographie faite à ce sujet, ne nous a pratiquement rien apporté . Tout au plus avons-nous relevé une réaction décrite par MULLER (58) en 1919 , pour l'acide salicylique et certains autres acides phénoliques : l'acide salicylique forme avec les sels d'uranyle une coloration rouge qui peut être utilisée pour le dosage même de ces sels . De même certains acides comme les acides gallique, tannique, résorcylique donnent avec les solutions diluées de sels d'uranyle des colorations marron. Cependant aucune précision quant à la nature du ou des produits colorés n'est donnée par l'auteur .

Par contre, avec l'acide salicylique et l'acide méthoxybenzoïque, considérés respectivement comme répondant aux formules H_2 A et HB, HOKBERNSTROM (40) a mis en évidence par une méthode de distribution en solvants les complexes $UO_2\ (HA)^+$, $UO_2\ (HA)\ OH$ et $UO_2\ (B)\ OH$.

Nous avons,de notre côté , essayé la réaction avec :

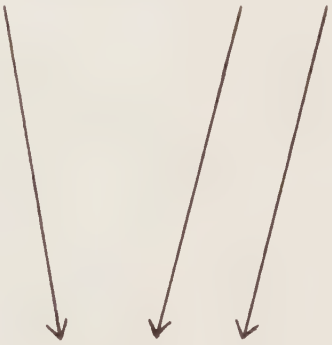
- la pyridine, de manière à tester le noyau pyridinique de la vitamine B_6 .
- le phénol , de manière à tester l'hydroxyle pseudo-phénolique de cette vitamine .
- le butène 1-4 diol; permettant de tester l'ensemble des deux fonctions alcools secondaires de la pyridoxine .

Les hypothèses quant à la structure du ou des complexes formés ne sauraient être envisagées en dehors de la structure électronique de l'atome d'uranium . Nous savons que cet atome possède six électrons en dehors de l'ensemble des couches saturées correspondant à l'atome de radon .

Les couches 1 (K), 2 (L), 3 (M) et 4 (N) sont totalement occupées . Par contre les couches 5 (O) et 6 (P) ne sont que partiellement occupées comme dans les métaux de transition de telle sorte que la répartition des électrons dans l'état fondamental proposée pat KATZ et SEABORG (43) :

$1s^2$, $2s^2$, $2p^6$, $3s^2$, $3p^6$, $3d^{10}$, $4s^2$, $4p^6$, $4d^{10}$,
$4f^{14}$, $5s^2$, $5p^6$, $5d^{10}$, $5f^3$, $6s^2$, $6p^6$, $6d^1$, $7s^2$

Les niveaux d'énergie 5f,6d et 7s sont assez voisins les uns des autres : les 6 électrons qui en font partie ont des positions qui ne sont pas déterminées de façon univoque . Ils constituent les électrons de valence (I)

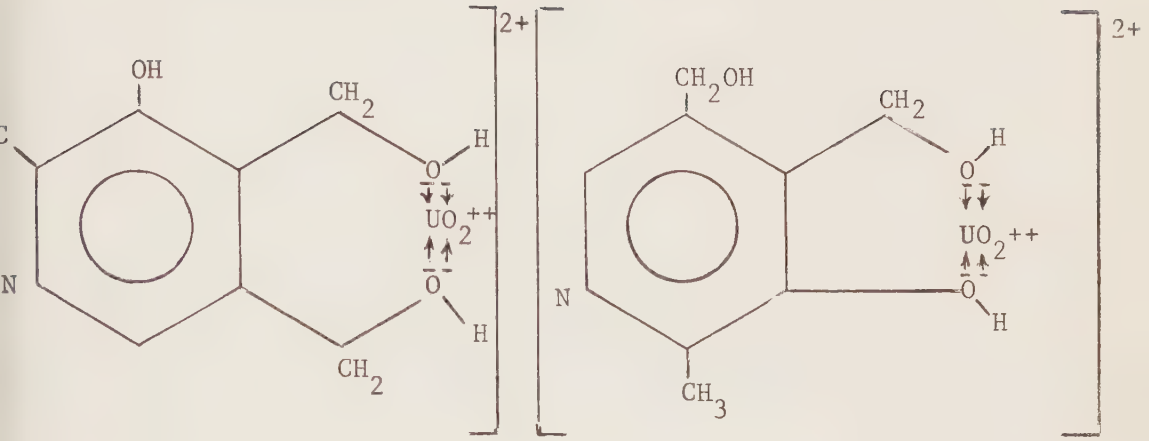


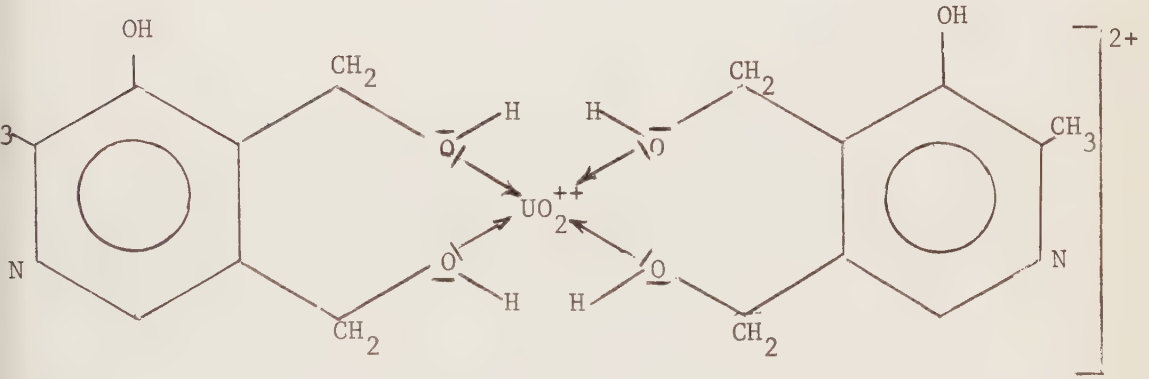
$5f^3$, $6d^1$, $7s^2$

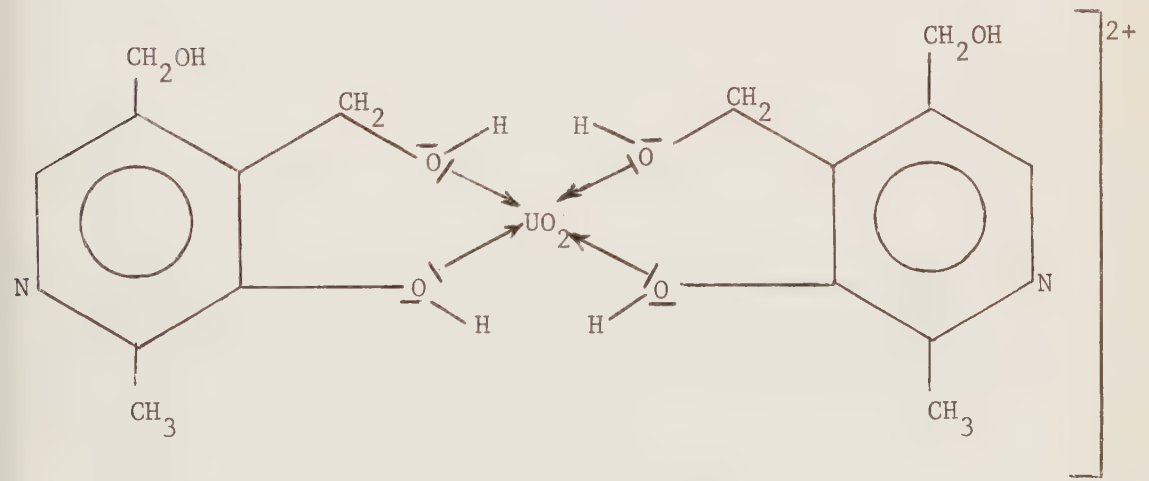
Structure préférée par PASCAL (62) : (II)

$6d^4$, $7s^2$

A partir de la structure I on peut envisager pour le cation UO_2^{++} la structure $5f^6$, $6d^2$ la charge provenant de la perte des deux électrons 7s . La saturation des niveaux 5f ou 6d nécessite donc 8 électrons : les doublets libres sur les atomes d'oxygène des deux groupements $-CH_2-OH$ et du groupement -OH pourraient parfaitement jouer ce rôle en conduisant à des cycles potentiels et à la formation de complexes chélatés . Les formules envisageables pourraient être les suivantes :


OH
CH2
H
O
UO2++
O
H
CH2
2+
CH2OH
CH2
CH3
N


OH
CH2
H
O
UO2++
CH3
N
2+


CH2OH
CH2
H
O
UO2
CH3
N
2+

CHAPITRE II

APPLICATIONS DE LA REACTION A L'ACETATE D'URANYLE AU DOSAGE DE LA PYRIDOXINE DANS LES MEDICAMENTS

°°°

En raison de son extrême simplicité, et malgré sa faible sensibilité (de l'ordre du milligramme dans la prise d'essai), nous avons appliqué la méthode exposée à certaines formes pharmaceutiques simples (Pyridoxine Labaz ampoules, Pyridoxine Adrian ampoules) aussi bien par voie manuelle que par voie automatique .

A / VOIE MANUELLE :

1°- Réactifs :

- solution étalon de pyridoxine base à 1g %o dans l'eau bi-distillée .

- réactif à l'acétate d'uranyle : ce réactif est constitué par une solution saturée d'acétate d'uranyle dans l'eau bi-distillée (réactif I) diluée au 1/2 dans la solution tampon de pH = 4,75 . Par précaution, filtrer avant l'emploi et conserver à l'abri de la lumière en flacon coloré .

2°- Protocole expérimental

Il suffit de diluer dans l'eau bi-distillée la solution à doser de manière à obtenir une solution contenant environ 1 gramme par litre de pyridoxine et de pratiquer la réaction de la manière suivante :

Dans cinq tubes T_1 , T_2 , T_3, T_D et T_B introduire successivement :

	T_1	T_2	T_3	T_D	T_B
Sol. étalon de pyridoxine base à 1 g °/oo	1 ml	2 ml	3 ml	--	--
Eau bi-distillée	2 ml	1 ml	--	1 ml	3 ml
Solution diluée à doser	--	--	--	2 ml	--
Réactif à l'acétate d'uranyle	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml

Agiter et lire T_1, T_2 et T_3 ainsi que T_D contre T_B à 440 mμ en cuve de 2cm d'épaisseur . Soit A_1, A_2 et A_3 les valeurs de l'absorption correspondantes à l'étallonage et A_D celle du dosage .

La courbe d'étalonnage est dressée avec A_1, A_2, et A_3, correspondant respectivement à 1, 2, 3mg dans la prise d'essai. D'après cette courbe, on détermine la quantité de pyridoxine base correspondant au dosage D. Soit xmg cette valeur. La quantité de pyridoxine sera en gramme par litre dans la solution à doser :

$$X = \frac{x \cdot 1000}{2} \cdot \text{taux de dilution}$$

B / VOIE AUTOMATIQUE

1° - Matériel

- Autoanalyser Technicon comprenant :
  - . 1 distributeur d'échantillons Sampler II
  - . 1 pompe proportionnante
  - . 1 colorimètre équipé d'un jeu de filtres 440 mμ
  - . 1 enregistreur.

2° - Réactifs

a) Solutions étalons de chlorhydrate de pyridoxine ou de pyridoxine base.

Nous donnons ici un exemple de la préparation de solutions étalons de chlorhydrate de pyridoxine :

Préparer une solution mère de chlorhydrate de pyridoxine à 100 g par litre. A partir de cette solution mère, préparer les différentes solutions étalons de la manière suivante :

- Solution mère	10ml	20	25	30	40	50	75	100
- Eau bi-distillée	90	80	75	70	60	50	25	-
- Concentration en g. p/l.	10	20	25	30	40	50	75	100

b) Réactif à l'acétate d'uranyle .

La constitution de ce réactif a déjà été envisagée précédemment pour la méthode manuelle .

c) Les différentes solutions à doser ne subissent aucun traitement préalable .

3°- Manifold

Le schéma du manifold, extrêmement simple est représenté sur la figure n°10 . Nous avons pour notre expérimentation réalisé un montage mettant en jeu deux tubes de prélèvement, respectivement de 0,42 m/minute et 0,80 ml/minute . Ceci nous permettait, en fonction de la concentration de la solution à doser de réaliser :

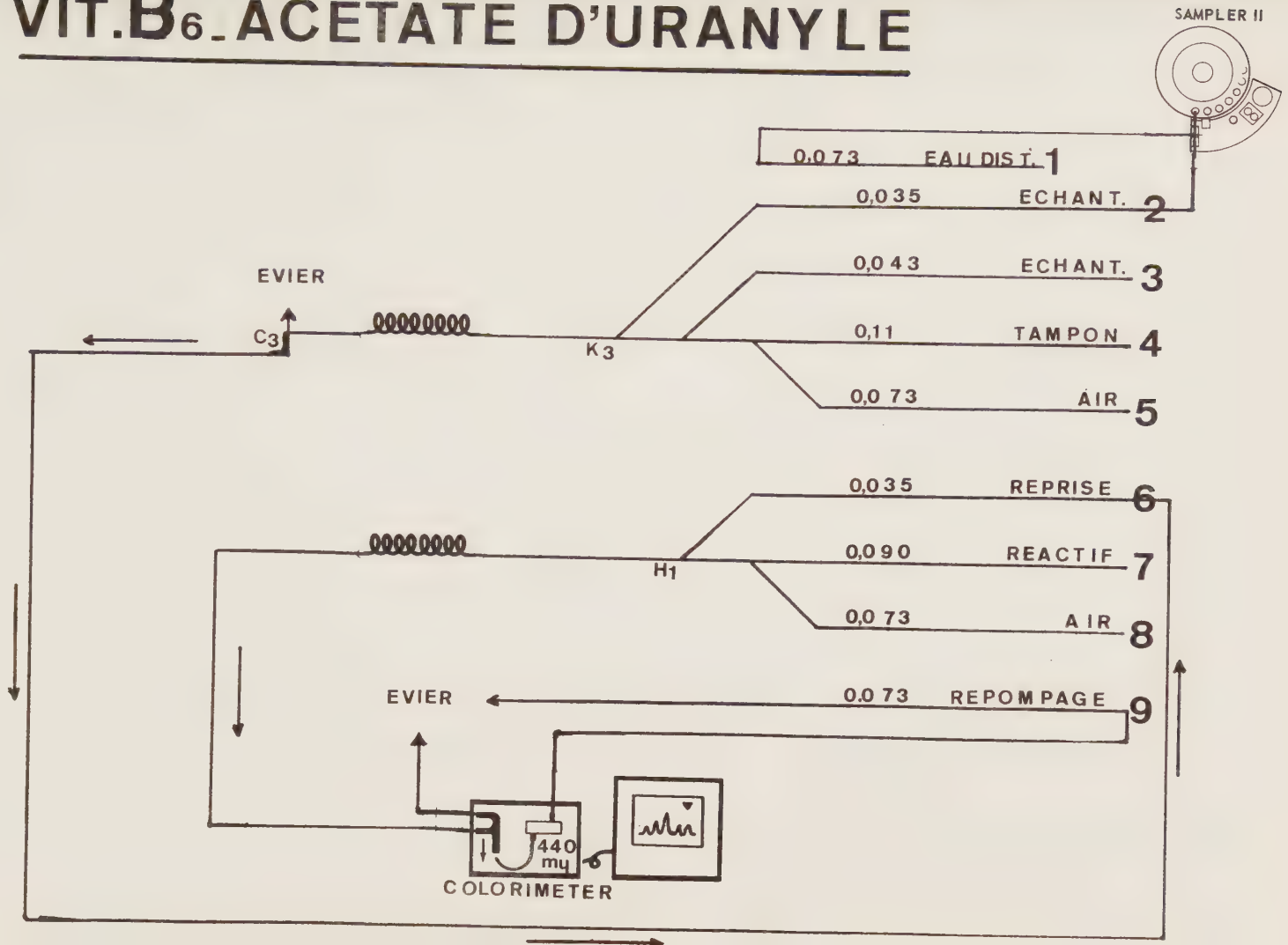
- avec le tube de 0,80 ml/minute un étalonnage avec des solutions à 10, 20, 30 et 40 g par litre pour des formes liquides contenant 25g par litre de chlorhydrate de pyridoxine .

- avec le tube de 0,42ml par minute un étalonnage au moyen des solutions à 25, 50, 75 et 100g par litre pour des formes liquides contenant 50g par litre de chlorhydrate de pyridoxine (Pyridoxine Adrian) .

Dans l'un et l'autre cas, le deuxième tube d'échantillonnage est plongé dans l'eau bi-distillée .

Dans ces conditions, l'échantillon, segmenté par de l'air est dilué dans l'eau bi-distillée (3, 90ml/minute) . Après passage dans une bobine de mélange, et débullage (C_3), un aliquot (0,42 ml/minute) est repris, segmenté par de l'air , et introduit dans le réactif à l'acétate d'uranyle ; l'ensemble , après mélange, pénètre dans la cuve à flux continu du colorimètre où la mesure est effectuée à 440 mμ . Le repompage est assuré par un tube (2ml/minute) repassant à la pompe proportionnante.

VIT.B_6 - ACETATE D'URANYLE



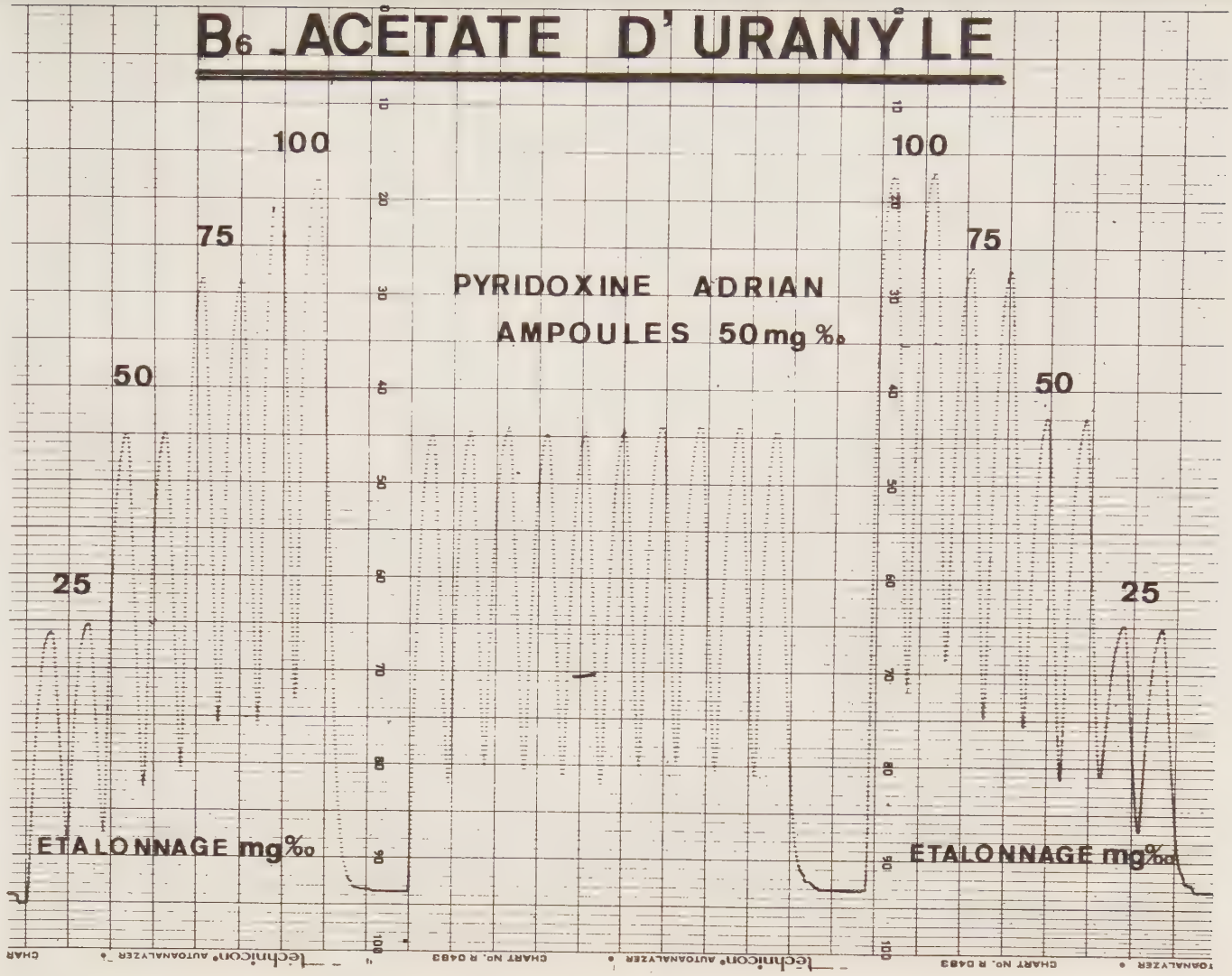


Figure n° 11 - Dosage automatique de la vitamine B6 par la réaction à l'acétate d'uranyle.

4°- Résultats

Sur la figure n°11 est représenté un enregistrement de 10 dosages réalisés sur des ampoules de Pyridoxine Adrian contenant 50g par litre de chlorhydrate de pyridoxine . Le montage utilisé permet une cadence de travail de 40 examens/heure, sans contamination d'un échantillon à l'autre , comme le montre la même figure .

En conclusion, nous pouvons dire, que la réaction entre l'acétate d'uranyle et la pyridoxine peut être employée à des fins quantitatives . D'une simplicité remarquable, elle pêche par contre par son manque de sensibilité et de spécificité . Quoi qu'il en soit, elle peut rendre de grands services pour le dosage de la pyridoxine base ou de ses sels (chlorhydrate et citrate), dans les formes pharmaceutiques non associées .

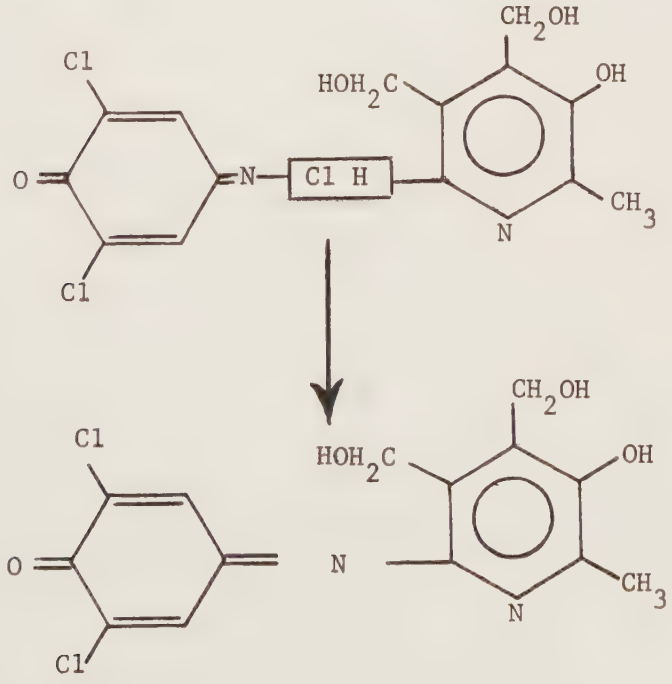
Mais dans le cadre du contrôle physico-chimique des médicaments, on rencontre de nombreuses spécialités contenant en plus de la pyridoxine d'autres principes actifs . Il nous a donc fallu choisir parmi les techniques existantes, celle qui présentait à nos yeux les meilleurs critères de sensibilité et de spécificité : nous avons choisi la méthode à la 2-6 dichloroquinone chlorimide .

DEUXIEME PARTIE

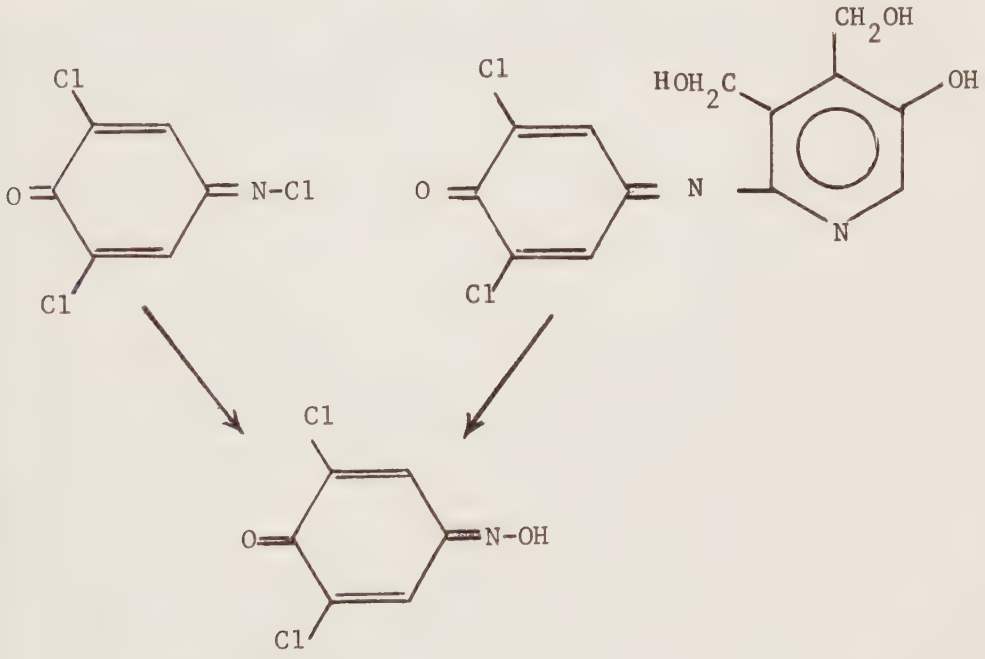
LA REACTION A LA 2-6 DICHLOROQUINONE CHLORIMIDE

Dans les différentes réactions précédemment citées, celle utilisant la 2-6 dichloroquinone chlorimide (29) a plus particulièrement retenu notre attention . Réaction générale des phénols non substitués en para, elle présente sur les autres méthodes existantes (33) (80) (13) (77) (81) (83) des avantages certains de sensibilité et de spécificité .

La structure chimique du produit coloré a été élucidée par SCUDI (71) et par GIBBS (30) . La réaction de copulation se produit aux dépens de l'hydrogène en para par rapport à l'hydroxyle pseudophénolique de la pyridoxine .



En milieu tamponné et en solution alcoolique, le dérivé de copulation possède une coloration bleue qui se prête à une mesure spectrophotométrique . D'après SCUDI (72) et GIBBS (29) la dissociation partielle du produit coloré d'une part, et la décomposition de la 2-6 dichloroquinone chlorimide d'autre part, apportent une coloration jaune parasite, par formation du dérivé hydroxylé correspondant à la 2-6 dichloroquinone chlorimide .



Malgré le nombre et le volume des travaux consacrés à l'étude de cette réaction , il nous a paru important :

1°- de reprendre l'étude systématique des différents facteurs de cette réaction : les résultats de cette étude font l'objet du premier chapitre .

2°- d'étendre l'application de cette réaction aux médicaments : il en résulte des problèmes de spécificité qui font l'objet du second chapitre .

3°- de proposer deux méthodes automatiques , l'une adaptée au dosage dans les formes liquides,l'autre réservée au dosage dans les formes solides : le chapitre III rapporte cette étude .

CHAPITRE I

ETUDE EXPERIMENTALE DES DIFFERENTS FACTEURS DE LA REACTION

...

I - MATERIEL, REACTIFS, PROTOCOLE EXPERIMENTAL.

A / MATERIEL

- SpectrophotomètreUnicam SP 800
- pH mètre thermostaté Quéré
- Bain-marie à température variable Lequeux .

B / REACTIFS

- Pyridoxine base .
- Méthanol R. P.
- Ethanol R. P.
- Butanol R. P.
- Isopropanol R. P.
- Véronal (BENDOR et HOBEIN)
- Véronal sodique (BENDOR et HOBEIN)
- Tampon Véronal-Acétate-HCl, selon MICHAELIS (57) .
- Tampon Boro -Acéto-Phosphorique de BRITTON et ROBINSON (12) (55) .

Ces deux tampons sont réservés à l'étude de l'influence du pH, leur constitution est rappelée dans les tableaux 4 et 5 .

- 2 -6 dichloroquinone chlorimide (D. C. Q. C.)
- Réactif à la D. C. Q. C.

Nous avons utilisé pour le début de cette expérience, un réactif contenant 250mg de 2-6 dichloroquinone chlorimide dans un litre de butanol . Ce réactif est à conserver en flacon brun au réfrigérateur . Nous verrons par la suite, que nous avons été amené à modifier sa concentration dans certains cas particuliers .

- Tampon véronal - HCl : dissoudre 18,40g de véronal sodique dans un litre d'eau bi-distillée . Ajuster à pH = 7,60 au moyen d'acide chlorhydrique 0,10 N. Ce tampon a été réservé à l'étude des facteurs de réaction autres que le pH .

C / PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Dans deux tubes T_1 et T_2 placer successivement :

	T_1	T_2
Solution aqueuse de pyridoxine	--	3 ml
Eau bi-distillée	3 ml	--
Alcool à 95°	16 ml	16 ml
Tampon Véronal - HCl	5 ml	5 ml
Réactif à la D.C.Q.C.	5 ml	5 ml

On mélange après addition de chaque réactif . Au bout d'un certain temps que nous préciserons , il se développe une coloration bleue dans le tube à réaction . Le tube T_1 prend une coloration jaune-gris qui s'accentue avec le temps .

II - ETUDE EXPERIMENTALE PROPREMENT DITE

Nous avons tout d'abord défini le spectre et les constantes d'absorption du produit coloré obtenu .

Nous avons ensuite étudié à la longueur d'onde d'absorption maxima l'influence de différents facteurs (pH, concentration en D. C. Q. C.) solvants, température) sur le spectre et sur la cinétique de la réaction colorée .

Enfin nous avons défini le domaine d'application de la loi de Beer-Lambert .

(voir tableaux IV et V pages suivantes)

SOLUTION A - Acétate de sodium, 3 H_2O ..... 19,43 g
- Véronal sodique ..... 29,43 g
- Eau bi-distillée Q.S.P. ..... 1000 ml
SOLUTION B - HCl 0,10 N
SOLUTION C - Chlorure de sodium ..... 8,50 g
- Eau bi-distillée Q.S.P. ..... 100 ml

pH	*SOL.A*	*SOL.B*	*SOL.C*	*Eau bi-distillée*
3	50 ml	154	20 ml	Q.S.P. 250 ml
3,5	"	143	"	"
4	"	125,5	"	"
4,5	"	105,5	"	"
5	"	88	"	"
5,5	"	76,5	"	"
6	"	71	"	"
6,5	"	67,5	"	"
7	"	60,5	"	"
7,5	"	46,5	"	"
8	"	26	"	"
8,5	"	11	"	"
9	"	4	"	"
9,5	"	0,50	"	"

TABLEAU IV

Gradient de pH des tampons Véronal-Acétate-Acide chlorhydrique

SOLUTION A - *Acide acétique* ..... *2,40 g*
- *Acide phosphorique* ..... *3,92 g*
- *Eau bi-distillée* ..... *Q.S.P. 1000 ml*

SOLUTION B - *Na OH N/5*

pH	*SOLUTION A*	*SOLUTION B*
5,02	40 ml	14 ml
6,09	""	17 ml
6,59	""	19 ml
7	""	21 ml
7,54	""	23 ml
7,96	""	24 ml
8,69	""	26 ml

TABLEAU V

Gradient de pH du tampon boro-acéto-phosphorique

Pour pouvoir réaliser l'étude de cette réaction où pH, température et solvants exercent des effets interdépendants les uns des autres , tant sur l'allure spectrale que sur la cinétique, l'utilisation d'un spectrophotomètre enregistreur double faisceau à programmation nous a été indispensable ; il nous permettait en effet :

- d' obtenir les spectres d'absorption de quatre réactions en moins d'une minute .
- de suivre automatiquement et simultanément les cinétiques des mêmes réactions .

Les résultats sont rassemblés dans les figures suivantes :

- Figure n° 12 : A = f (λ) Spectre d'absorption .
- Figures n°13 et 14 : A = f (pH) Facteur pH système tampon Véronal-Acétate Na-HCl.
- Figure n° 15 : A = f (pH) Facteur pH système tampon boro-acéto-phosphorique.
- Figure n°16 : A = f (pH) Cinétiques comparées en tampon véronal et boroacéto-phosphorique .
- Figure n° 17 : A = f (D. C. Q. C.) Influence de la concentration en D. C. Q. C.
- Figure n° 18 : Spectres des blancs réactifs lus contre de l'eau bi-distillée .
- Figure n° 19 : A = f (solvants) Influence du solvant sur la réaction .
- Figure n° 20 : A = f (C) Loi de Beer-Lambert .

III - DISCUSSION DES RESULTATS

A / ETUDE DU SPECTRE D'ABSORPTION A=f(λ) (figure n° 12)

Réalisée suivant le protocole opératoire décrit précédemment, la réaction présente un maximum d'absorption situé à λ = 645 mμ . Ce maximum est différent de celui obtenu par GIBBS (30) en phase aqueuse . Cet auteur notait, en effet un maximum d'absorption pour une λ = 610 mμ . D'autres auteurs, comme HOCHBERG (37) également en phase aqueuse obtiennent un maximum situé à λ = 620 mμ . Nous avons, pour notre part en effectuant chaque lecture contre le blanc réactif, toujours observé ce maximum à 645 mμ , tout au moins pendant les phases de développement et de stabilité de la réaction colorée . En effet, après la phase de stabilité, la coloration disparaît peu à peu, pour revenir au bout d'une heure environ, à celle du blanc de la réaction .

B / ETUDE DE L'INFLUENCE DU pH .

Cette étude a été réalisée au moyen de deux systèmes tampons .

1°- Système tampon Véronal-acétate HCl (figures n° 13 et 14)

Nous avons étudié la zone des pH comprise entre 2,60 et 9,60 en utilisant un gradient de pH d'environ 0,5 unité . Réalisée dans les conditions opératoires précédentes, cette étude a donné les résultats suivants :

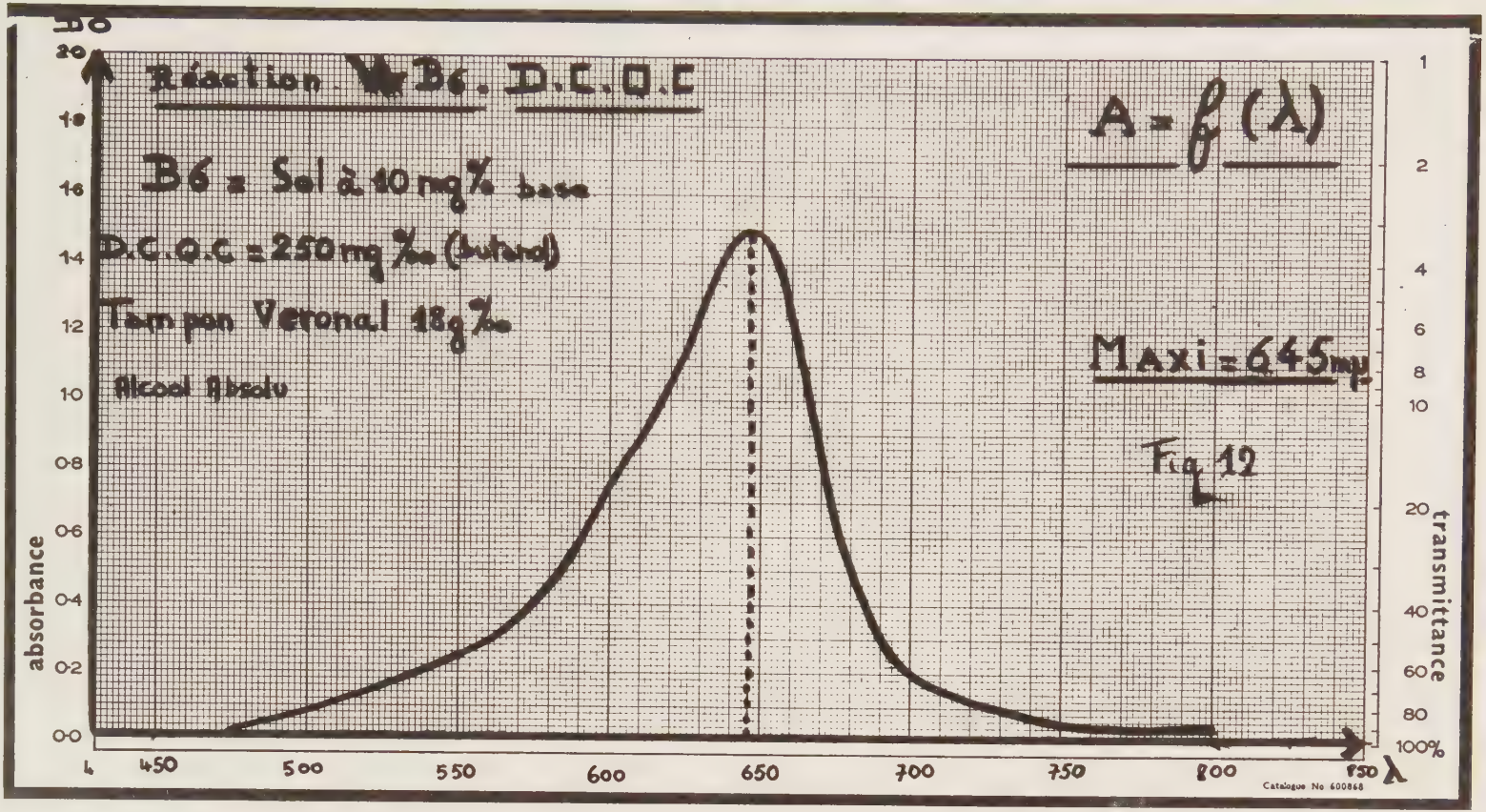


Figure n° 12 - D.C.Q.C. - A = f(λ) - Spectre d'absorption

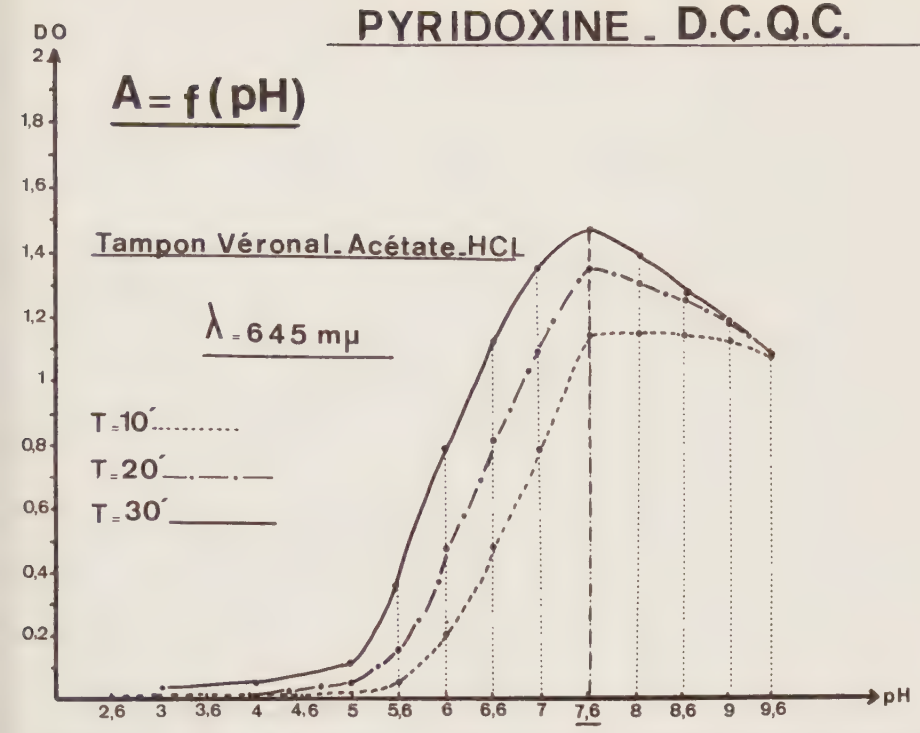


Figure n° 13 - A = f(pH) - Facteur pH. Tampon Véronal - Acétate de sodium - HCl

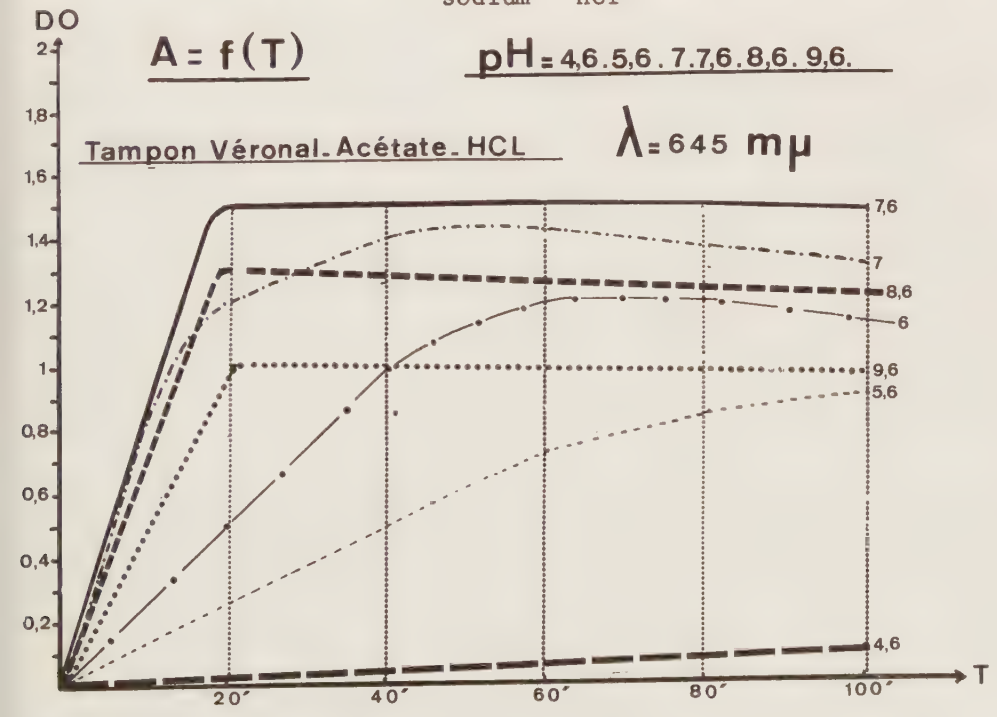


Figure n° 14 - A = f(pH) et f(T) - Facteur pH. Tampon Véronal - Acétate de sodium - HCl.

a) Sur le plan de l'allure spectrale

- Aspect qualitatif Pour les pH permettant un développement de la coloration, aucune modification qualitative du spectre n'a été notée, le maximum se situant toujours à λ = 645 mμ . En ce qui concerne les blancs, il faut noter une coloration jaune, plus importante dans la zone des pH alcalins, probablement due à la formation à partir de la 2-6 dichloroquinone-chlorimide du dérivé hydroxylé correspondant, comme nous l'avons déjà signalé .

- Aspect quantitatif . La figure n°13 montre les densités optiques obtenues pour chacun des pH envisagés, à des temps différents choisis arbitrairement : 10, 20, et 30 minutes . La réaction colorée ne se développe pratiquement pas pour des pH inférieurs à 5,50 . L'intensité augmente ensuite rapidement, pour passer par un maximum correspondant à un pH de 7,60 .

b) Sur le plan de la cinétique

La cinétique est un des points les plus discutés par les différents auteurs . HOCHBERG, MELNICK et OSER (38) travaillant en milieu aqueux et en tampon chlorure d'ammonium-ammoniaque de forte basicité , obtiennent une cinétique très rapide : le maximum d'intensité est atteint en soixante secondes et la coloration très fugace disparaît rapidement . Dans ces conditions, une mesure précise est de réalisation difficile . L'introduction d'alcool éthylique retarde considérablement le développement de la coloration et la rend beaucoup plus stable. Nous avons obtenu les résultats suivants (figure n°14) :

- Pour un pH de 5,60 , le maximum d'intensité de la coloration n'est atteint pratiquement qu'au bout de 100 minutes et présente un plateau de stabilité d'environ une vingtaine de minutes .

- Pour les pH = 6 et 7 , la cinétique de la réaction est un peu plus rapide, le maximum d'intensité est obtenu en effet au bout d'environ 50 minutes . Par contre le plateau de stabilité est moins satisfaisant , car il ne dure qu'une dizaine de minutes .

- Pour les pH = 7,60, 8, 8,60, 9, 9,60 , la cinétique de la réaction s'accélère encore . Dans tous les cas en effet, le maximum d'intensité de la coloration est atteint vingt minutes et même pour un pH de 7,60 quinze minutes après l'introduction de la 2-6-dichloroquinone chlorimide . Le plateau de stabilité qui lui fait suite est assez important, notamment à pH = 7,60 , pour lequel il est de l'ordre de quarante cinq minutes environ . Cette étude de l'influence du pH sur l'intensité de la réaction colorée et sur sa cinétique , nous a permis de conclure que la meilleure réaction est celle qui est effectuée avec un tampon Véronal-acétate-HCl de pH = 7,60 . Ce tampon est en effet celui qui, pour un maximum de sensibilité, donne la réaction la plus stable . D'autre part, à ce pH, le blanc réactif n'est que faiblement coloré .

2°- Système tampon boro-acéto-phosphorique (figure n° 15).

Nous avons étudié la zone des pH comprise entre 6 et 8,5 en utilisant un gradient de pH de 0,5 unité suivant les données du tableau V . Réalisée toujours dans les mêmes conditions, cette étude nous a fourni les résultats suivants :

a) Sur le plan de l'allure spectrale

- Aspect qualitatif .

Les mêmes constatations que celles effectuées pour le système tampon Véronal peuvent être faites ici : nous n'observons pas de modification de l'allure spectrale.

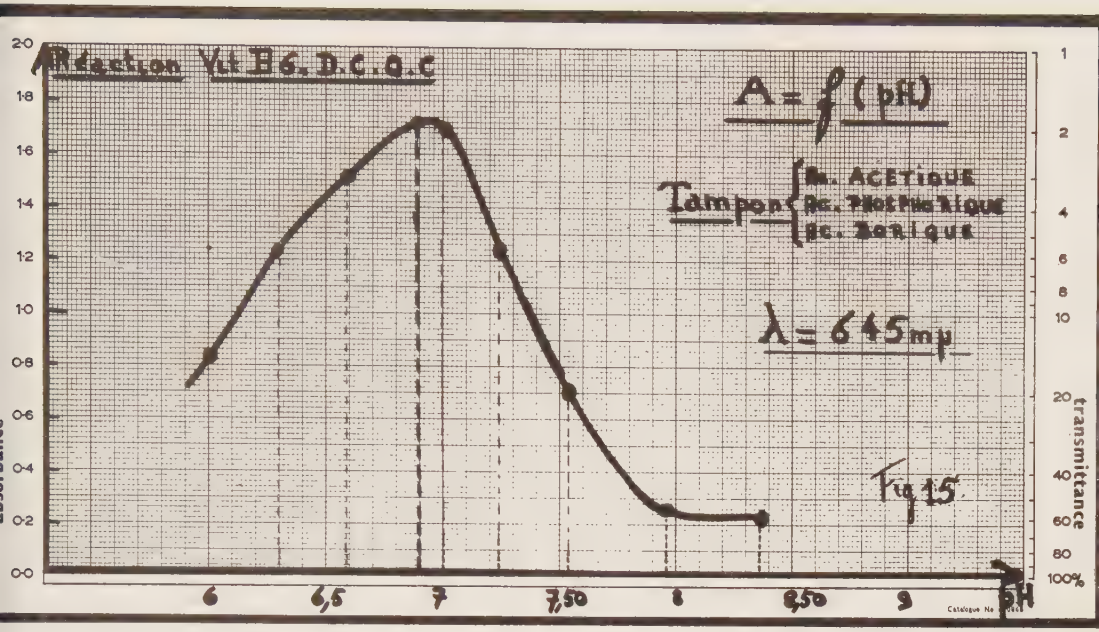


Figure n° 15 - A = f(pH) - Tampon boro-acéto-phosphorique.

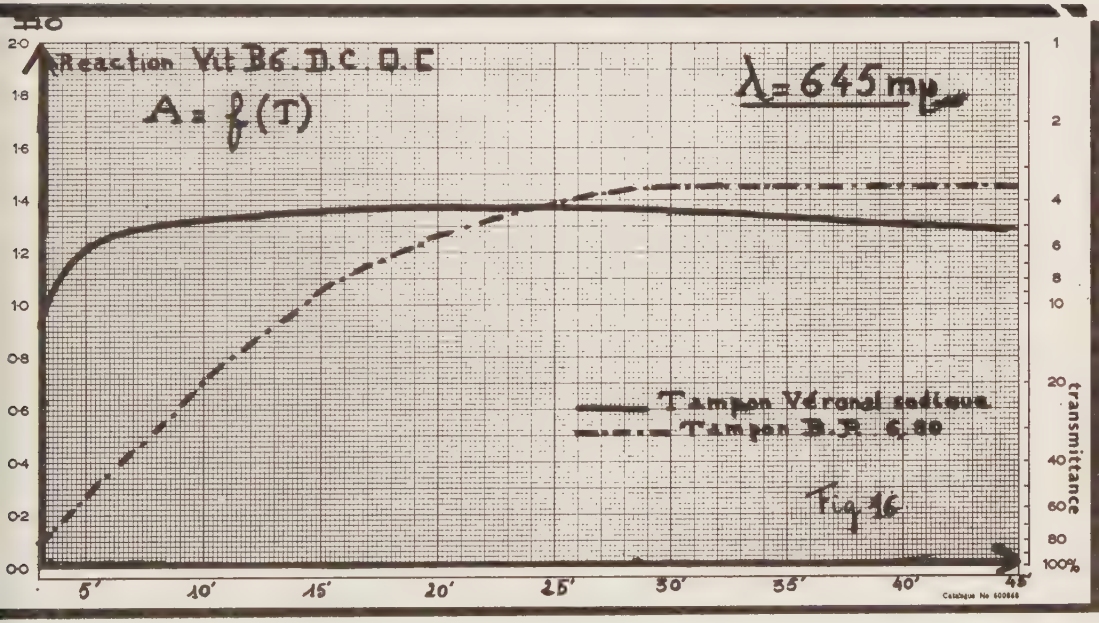


Figure n° 16 - A = f(T) - Cinétiques comparées en Tampon Véronal et de Britton et Robinson.

- Aspect quantitatif

La figure n° 15 montre que la réaction ne se développe pratiquement pas pour des pH inférieurs à 5 , comme nous l'avions observé avec le tampon Véronal-acétate-HCl . Par contre le maximum d'intensité est obtenu ici pour un tampon de pH = 6,80 diminuant ensuite rapidement pour devenir pratiquement nul à pH = 8 .

b) Sur le plan de la cinétique

Les cinétiques obtenues aux différents pH sont identiques . Le maximum d'intensité n'est atteint, dans aucun cas, avant trente minutes . La figure n° 16 montre deux cinétiques de la réaction, effectuées en tampon véronal et en tampon de Britton et Robinson, aux pH optima dans chacun des cas . Avec le tampon boro-acéto-phosphorique on obtient une cinétique retardée, mais dans les deux cas le plateau de stabilité obtenu, est voisin aussi bien sur le plan qualitatif que sur le plan quantitatif . Cette différence s'explique probablement par l'inhibition déjà signalée par SCUDI (73) (70) qu'exerce l'acide borique vis-à-vis de cette réaction et dont nous reparlerons ultérieurement .

C / ETUDE DE LA CONCENTRATION EN 2-DICHLOROQUINONE-CHLORIMIDE

Quatre réactions ont été réalisées, avec la même quantité de vitamine B_6 , en milieu alcoolique, en tampon Véronal de pH = 7,60, mais avec des réactifs à la D. C. Q. C. de concentrations variables : 250, 500, 750 et 1000mg par litre de butanol . Les résultats présentés dans la figure n° 17 montrent que :

Sur le plan de l'allure spectrale

- Aspect qualitatif

La modification de la concentration du réactif n'entraîne aucune variation qualitative du spectre d'absorption .

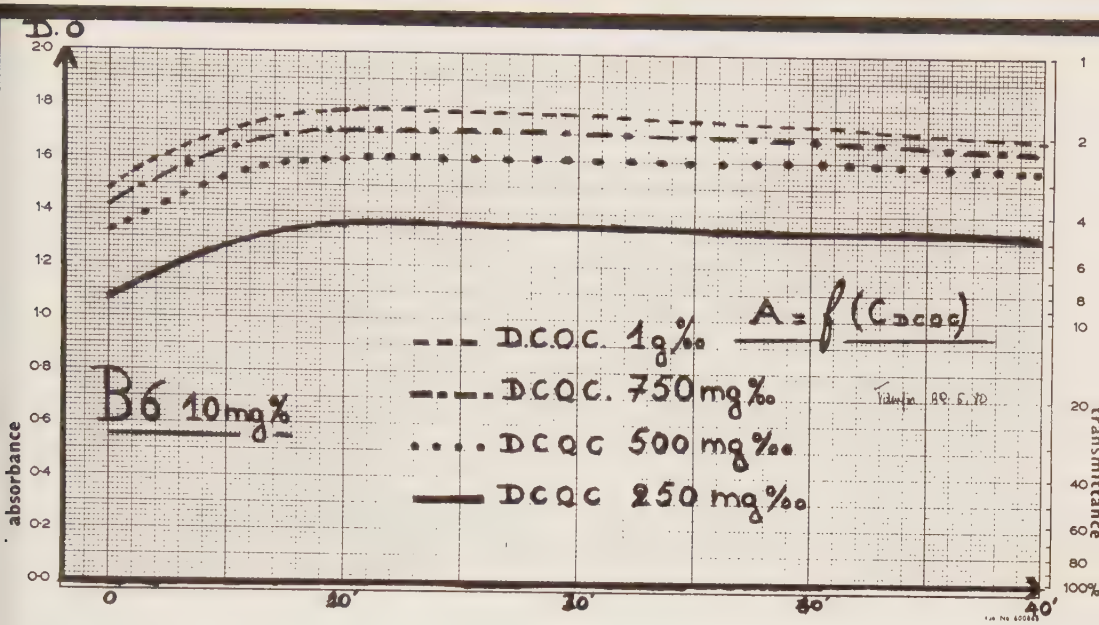


Figure n° 17 - A = f(C.D.C.Q.C.) - Influence de la concentration en D.C.Q.C.

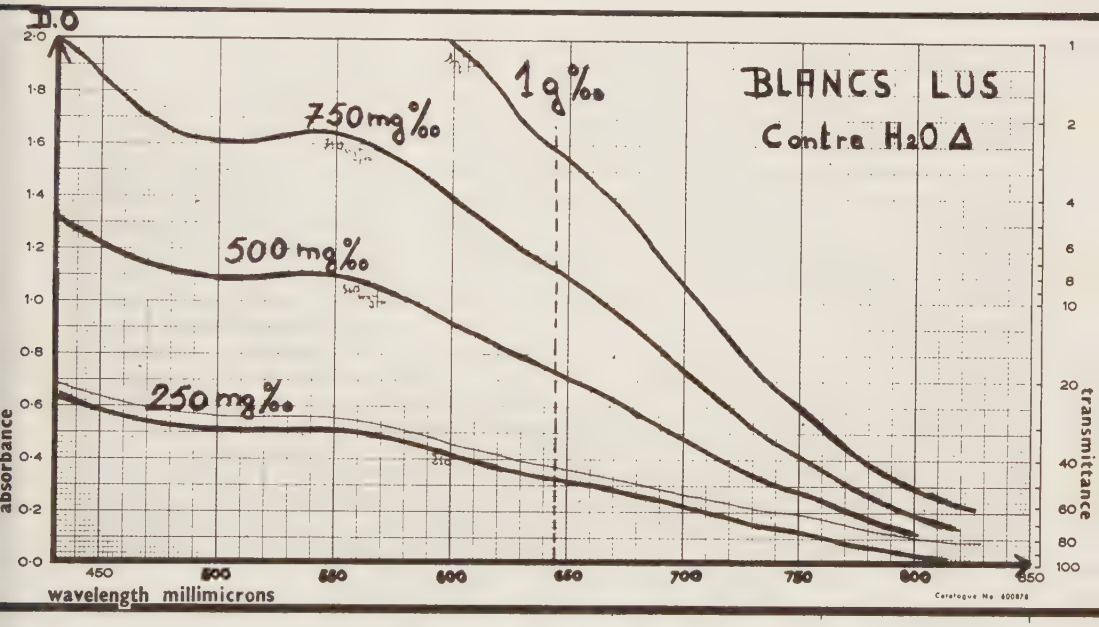


Figure n° 18 - Spectres des blancs réactifs lus contre de l'eau distillée.

- Aspect quantitatif

On peut voir que des concentrations de 500, 750 et 1000mg par litre donnent des résultats, voisins entre eux mais supérieurs à ceux obtenus avec une D. C. Q. C. à 250mg par litre . Cependant, la figure n°18 montre que les spectres des blancs réactifs ainsi obtenus, lus contre de l'eau distillée, présentent une absorption très importante à 645 mμ . Dans ces conditions, à moins de cas particuliers, sur lesquels nous reviendrons ultérieurement, le réactif à 250mg par litre nous paraît le plus indiqué .

- Sur le plan cinétique

Les quatre réactions présentent une cinétique en tout point comparable .

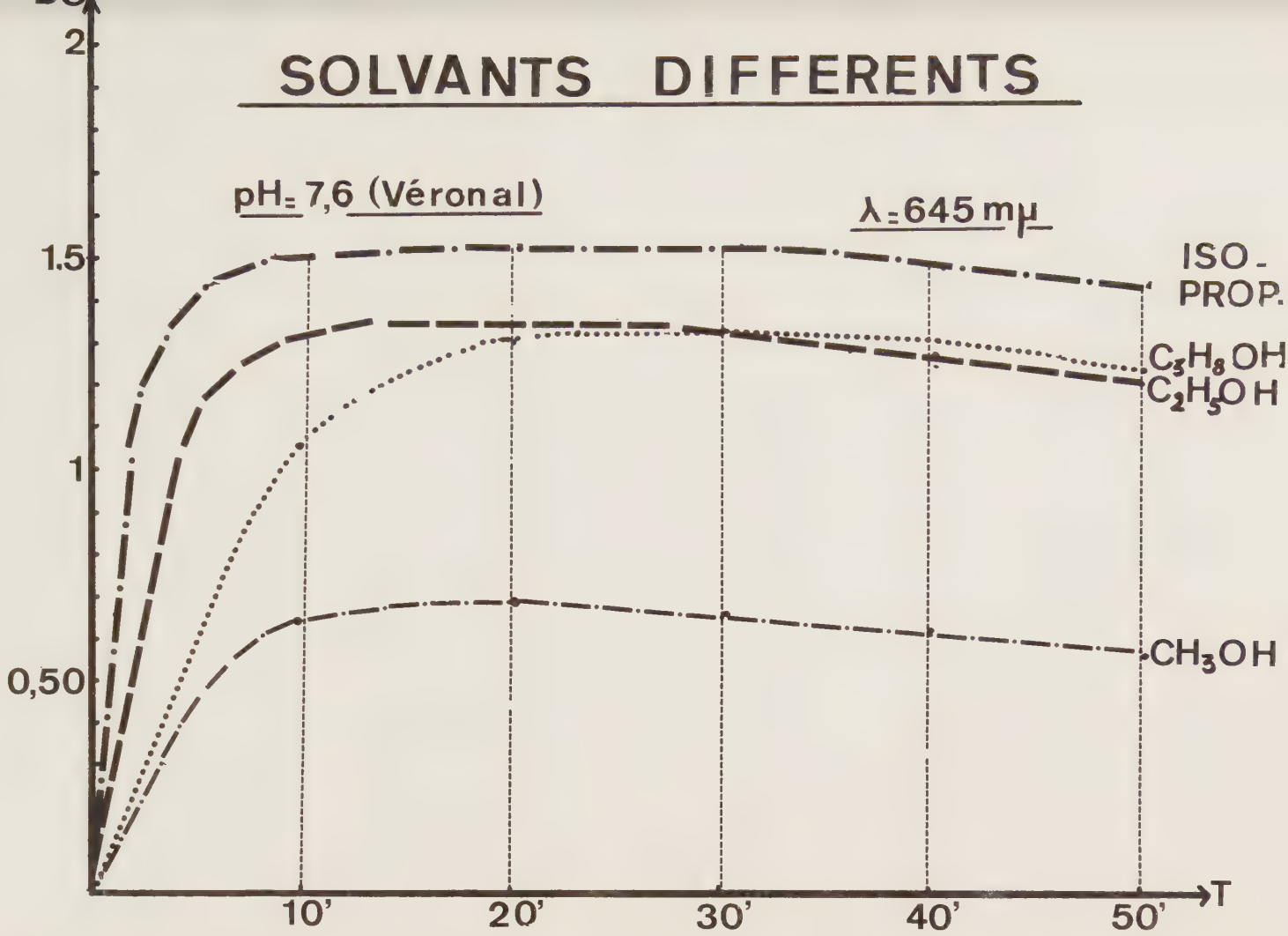
D / ETUDE DES DIFFERENTS SOLVANTS DE LA REACTION

1°- Solvants de la D. C. Q. C.

Nous avons réalisé plusieurs réactions, en milieu éthanolique et en tampon Véronal, mais en dissolvant la D. C. Q. C. respectivement dans le méthanol, l'éthanol, le propanol, l'isopropanol, le butanol, l'acétate d'éthyle et l'acétate d'isoamyle . Sur les plans de l'allure spectrale de la réaction colorée, de sa cinétique, et de son intensité, les résultats ne révèlent aucune différence caractéristique .

2°- Solvants de la réaction (figure n°19)

Cette expérimentation a été réalisée avec le méthanol, l'éthanol, le propanol et l'isopropanol, les autres solvants n'étant pas utilisables en raison de leur non miscibilité avec la solution aqueuse de pyridoxine utilisée et le tampon Véronal . Les résultats suivants ont été obtenus :


SOLVANTS DIFFERENTS
pH = 7,6 (Véronal)
λ = 645 mμ
2
1.5
1
0,50
ISO-PROP.
C3H8OH
C2H5OH
CH3OH
10'
20'
30'
40'
50'
T

a) Sur le plan de l'allure spectrale

- Aspect qualitatif

Nous n'avons noté aucune différence caractéristique, le maximum d'absorption de la coloration est toujours situé à $\lambda = 645 m\mu$ quel que soit le solvant utilisé.

- Aspect quantitatif

Sur le plan de la sensibilité l'éthanol, le propanol et l'isopropanol ont un comportement à peu près similaire . Le méthanol, par contre, conduit à une coloration beaucoup moins intense .

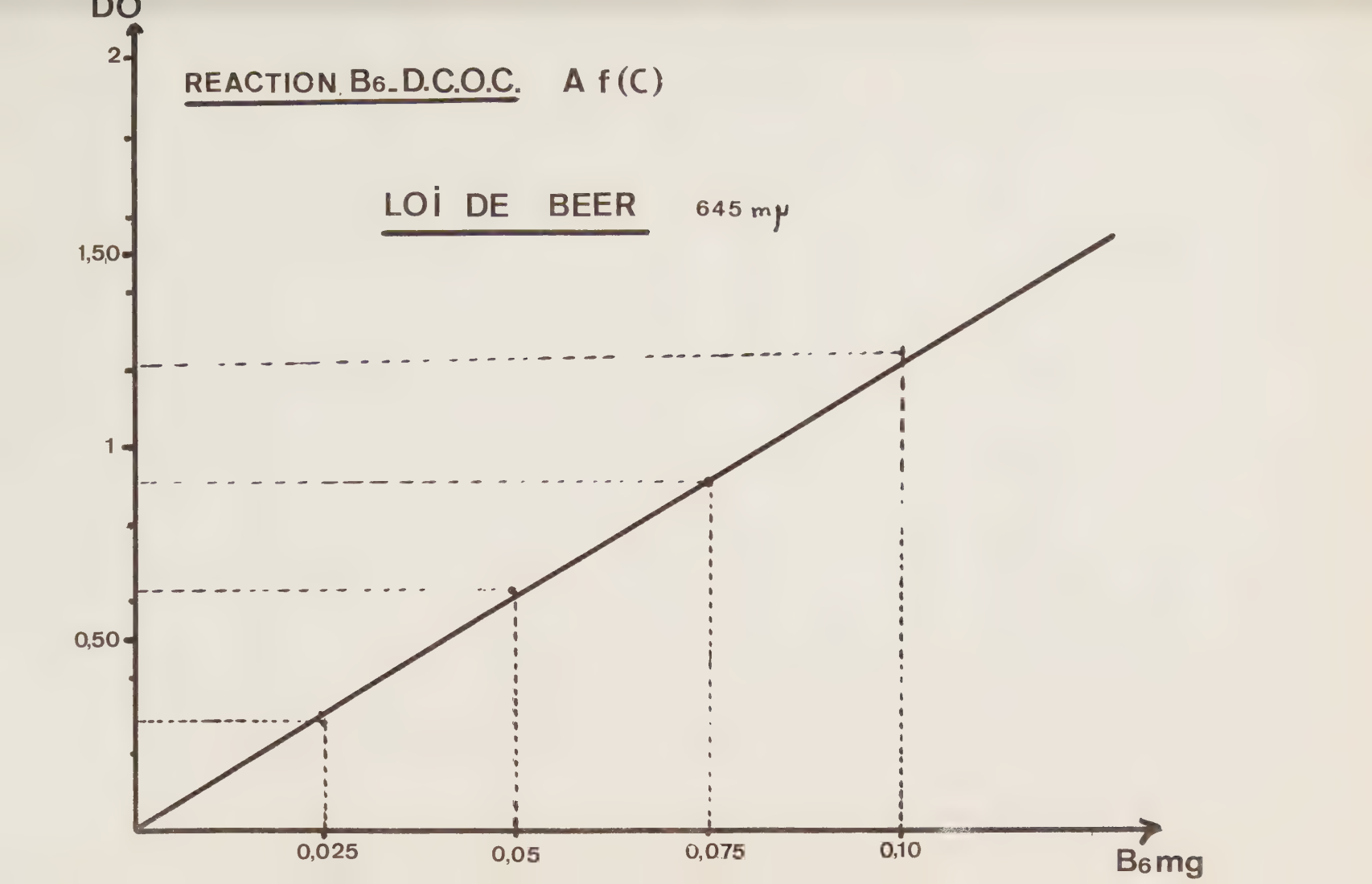
b) Sur le plan de la cinétique

L'éthanol, le méthanol et l'isopropanol présentent un comportement analogue : le maximum de la coloration est obtenu au bout de quinze minutes environ, et demeure stable pendant quarante-cinq minutes.Avec le propanol , la cinétique est plus lente: le maximum de coloration n'est atteint qu'au bout de 25 à 30 minutes .

En conclusion , si de nombreux solvants peuvent être utilisés pour la préparation du réactif à la D. C. Q. C. , il est nécessaire d'utiliser l'éthanol ou l'isopropanol comme solvant de la réaction colorée, de manière à obtenir une bonne intensité et une stabilité satisfaisante . Le butanol nous paraît le solvant de choix pour préparer le réactif à la D. C. Q. C. car il assure une conservation supérieure à celle fournie par les autres solvants essayés .

E / ETUDE DE L'INFLUENCE DE LA TEMPERATURE

Dans cette réaction, l'élévation de la température accélère la vitesse de développement de la coloration.Mais cette propriété va de pair avec une nette diminution du plateau de stabilité . Dans ces conditions, il nous paraît contre-indiqué d'élever la température .


DO
2
REACTION B6-D.C.O.C. A f(C)
LOI DE BEER 645 mμ
1,50
1
0,50
0,025
0,05
0,075
0,10
B6 mg

F / VERIFICATION DE LA LOI DE BEER-LAMBERT (figure n°20)

Dans les conditions précédemment décrites , la réaction obéit à cette loi dans le domaine de concentration compris entre 0, 025mg et 0, 10mg de chlorhydrate de pyridoxine .

Au terme de cette étude, nous proposons la technique suivante :

Dans cinq tubes T_1 , T_2 , T_3, T_D et T_B introduire successivement :

	T_1	T_2	T_3	T_D	T_B
Sol.aqueuse de pyridoxine base à 10 mg %	0,25	0,50	1	--	--
Eau distillée	2,75	2,50	2	2,50	3
Sol. à doser 10 mg %	-	-	-	0,50	--
Tampon véronal acétate Na HCl pH = 7,60	5	5	5	5	5
Ethanol	16	16	16	16	16
D.C.Q.C.	5	5	5	5	5

Agiter après l'addition de chaque réactif . Lire T_1, T_2, T_3 et T_D contre T_B en cuve de 1cm après 15 minutes . La courbe d'étalonnage est dressée avec A_1 , A_2 et A_3 correspondant respectivement à 0,025 , 0,050 et 0,10mg de pyridoxine base . D'après cette courbe on détermine la quantité de pyridoxine base correspondant au dosage D. Soit x mg cette valeur . La quantité de pyridoxine sera en gramme par litre dans la solution à doser .

$$X = 2000 \text{ x . taux de dilution .}$$

Cette technique nous paraît présenter sur les techniques précédemment décrites (phase aqueuse ou phases non miscibles butanol-eau), d'indiscutables avantages sur les plans de la sensibilité, de la cinétique et de la simplicité .

CHAPITRE II

APPLICATIONS AUX MEDICAMENTS : SPECIFICITE ET INTERFERENCE

°°°

Lorsque l'on veut adapter une technique de dosage au contrôle analytique des médicaments terminés, le critère de spécificité est de beaucoup le plus important . L'analyse des médicaments à base de vitamines n'échappe pas à cette règle car les spécialités polyvitaminées sont très souvent fort complexes ; dans ce domaine, le problème des interférences est fondamental : il fait l'objet du présent chapitre .

La réaction à la D. C. Q. C. appliquée au dosage de la pyridoxine peut être faussée de deux façons :

- Certaines substances capables de réagir comme la pyridoxine, avec la D. C. Q. C. conduisent à une réaction colorée parallèle et conduisent à des réactions faussement positives .

- D'autres substances au contraire, agissent en empêchant le développement normal de la réaction colorée . Elles entraînent donc de fausses réactions négatives .

A / ETUDE DES "FAUSSES REACTIONS" POSITIVES EVENTUELLES

La réaction à la 2-6-dichloroquinone-chlorimide est une réaction générale des phénols non substitués en para(SCUDI (72)-) . Ces substances peuvent donc interférer

directement . Il faut également signaler l'interférence de nombreuses substances parmi lesquelles la créatinine, la créatine, l'acide urique, la phénylhydrazine ..... etc . En plus, de ces différents composés, nous avons voulu tester plus particulièrement d'autres vitamines qui sont fréquemment associées à la pyridoxine dans les médicaments :

- La thiamine (vitamine B_1)
- La riboflavine (vitamine B_2)
- L'acide panthothénique
- L'amide de l'acide nicotinique (vitamine PP)
- L'acide ascorbique (vitamine C) (1)

a) La vitamine B_1

donne une légère coloration jaune déjà signalée par RAYBIN (68) . Cette coloration n'a aucune parenté spectrale avec celle que l'on obtient pour la pyridoxine . A 645 mμ , l'interférence de la thiamine, dans les conditions de concentrations où elle se trouve habituellement dans les spécialités pharmaceutiques peut-être considérée comme négligeable . En effet, pour deux solutions de concentrations identiques en B_1 et B_6 l'interférence de la coloration due à la thiamine est inférieure à 1% de celle obtenue pour la pyridoxine .

b) Les autres composés à action vitaminique

que nous avons cités précédemment, ne donnent aucune réaction de coloration à la 2-6-dichloroquinone chlorimide .

(1) *Ces produits nous ont été fournis gracieusement par les Laboratoires ROCHE , que nous remercions très vivement.*

c) En plus de ces composés, nous avons voulu tester deux corps rencontrés fréquemment comme conservateurs dans les spécialités polyvitaminées: nipagine et nipasol . Nous n'avons noté en opérant sur une concentration finale de 3mg de chacun de ces deux composés aucune interférence possible de ces deux produits .

B / MOYENS DE CONTROLE DES INTERFERENCES : UTILISATION DU COMPLEXE BORIQUE

SCUDI (72) a proposé l'utilisation d'un système à deux phases eau-butanol qui permettrait de séparer de la pyridoxine d'après les coefficients de partage la plupart des phénols substitués en para .

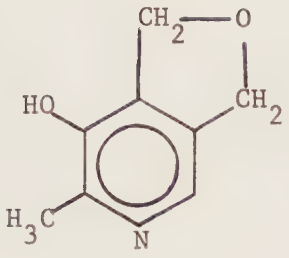
On peut aussi réaliser deux réactions :

a) L'une normalement effectuée suivant le protocole opératoire précédemment décrit .

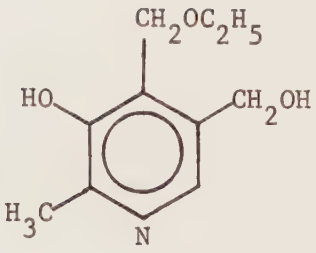
b) L'autre, effectuée en présence d'acide borique, inhibant spécifiquement la réaction de la pyridoxine .

BOESEKEN (10) avait déjà rapporté que l'acide borique pouvait former des complexes avec les composés orthodihydroxylés . Ces composés se trouvent alors masqués à leurs réactifs habituels . SCUDI (71) pense que cette théorie s'applique à la pyridoxine, en raison des analogies de structure qu'elle présente avec de tels composés. Pour connaître la nature du complexe formé entre l'acide borique et la vitamine B_6 , différentes expérimentations ont été réalisées :

- Les composés (I) et (II) se sont montrés capables de donner une réaction avec la 2-6-dichloroquinone-chlorimide, en présence d'acide borique .



(I)



(II)

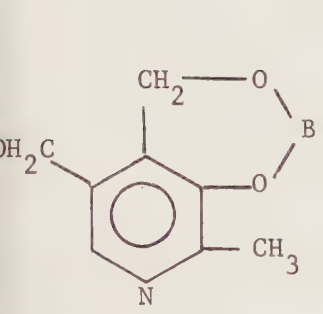
Ceci semble prouver que la fonction alcool secondaire en ortho par rapport à l'hydroxyle pseudo-phénolique, est engagée dans le complexe borique .

- La spectrophotométrie ultra-violette de la pyridoxine et de son complexe avec l'acide borique, a donné également d'importants renseignements , quant à la nature de ce complexe .

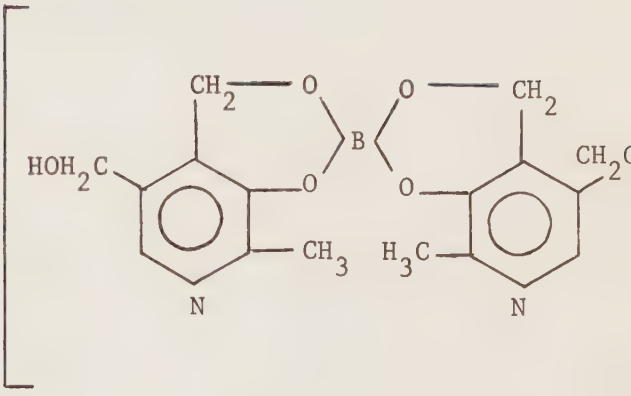
En effet, en milieu acide, la vitamine B_6 présente un maximum d'absorption pour une longueur d'onde de 292 mμ .

En milieu neutre à pH = 7 , le pic à 292 mμ a disparu pour faire place à un nouveau maximum situé à λ = 325 mμ.

Or, en présence d'acide borique et à pH = 7 , le maximum à 325 mμ n'apparaît plus et l'on peut au contraire observer le pic situé à 292 mμ . HARRIS et Coll. (34) ont attribué cette propriété à l'hydrogène phénolique de la vitamine . Le fait que le pic à 325 mμ disparaisse en tampon borique, semble prouver que l'hydroxyle pseudophénolique est engagé dans le complexe acide borique-pyridoxine .



A



B

Ces différentes expériences ont permis d'établir deux formules A et B, mais des expérimentations plus précises notamment la titrimétrie en milieu non aqueux, permettent de retenir la structure B .

HOCHBERG (39) signale qu'il faut se trouver en excès de borate pour observer une complète inactivation de la réaction colorée . Ceci confirme les résultats que nous avions pu obtenir avec le tampon de Britton et Robinson contenant de l'acide borique ; il n'y avait pas assez d'acide borique pour inhiber totalement la réaction; cependant il y avait un certain retard cinétique par rapport à la réaction effectuée en tampon Véronal .

Ainsi donc, lors des deux réactions décrites précédemment :

- La première, dans les conditions normales, donnera l'ensemble substances interférentes + pyridoxine .

- La deuxième, en présence d'acide borique, ne donnera que la part due aux substances interférentes .

Par différence entre les deux valeurs obtenues, on connaîtra la part réellement due à la vitamine B_6 dans le mélange .

En pratique , la réaction sera faite de la manière suivante :

a) Réactifs

- Solution étalon de pyridoxine base à 10mg %
- D. C. Q. C. : 250mg dans un litre de butanol
- Ethanol R. P.
- Tampon Véronal-acétate-HCl de pH = 7,60 décrit précédemment .
- Solution d'acide borique à 5g% ramenée àpH=7,6 par addition d'HONa "N" .

b) Protocole expérimental

	T_1	T_2	T_3	T_{D1}	T_{D2}	T_B
Solution étalon	0,5	1	2	-	-	-
Eau bi-distillée	1,5	1	-	1	-	2
Sol. Ac. Borique	-	-	-	-	1	-
Sol. à doser	-	-	-	-	1	-
Ethanol	16	16	16	16	16	16
Tampon Véronal	5	5	5	5	5	5
D.C.Q.C.	5	5,10	5,20	5	5	5
Pyridoxine mg	0,05	0,10	0,20	x_1	x_2	0

Lire T_1 , T_2, T_3, T_{D1} et T_{D2} contre T_B à 645 mμ après 15 minutes en cuve de 1cm. Dresser la courbe obtenue pour T_1 , T_2 et T_3 correspondant respectivement à 0,05, 0,10 et 0,20mg de pyridoxine base . Déterminer les valeurs x_1 mg et x_2 mg pour les tubes D_1 et D_2 . La valeur exprimée en mg % de pyridoxine base contenue dans la solution à doser sera :

$$X = (x_1 - x_2) . \text{ par le taux de dilution } . 100$$

C / ETUDE DES FAUSSES REACTIONS NEGATIVES (INHIBITIONS)

L'étude d'une éventuelle inhibition par les vitamines précédemment citées (thiamine, riboflavine , acide pantothénique, amide de l'acide nicotinique, acide ascorbique) dans la réaction à la 2-6 dichloroquinone-chlorimide, a été conduite en pratiquant comparativement une réaction avec la pyridoxine seule et une autre réaction en associant à tour de rôle pyridoxine et chacune des autres vitamines . Cette étude a été réalisée pour ces diverses vitamines dans les conditions de concentration que l'on rencontre habituellement dans les spécialités pharmaceutiques . Les résultats suivants ont pu être observés ;

a) La thiamine, la riboflavine, le panthénol et la vitamine PP ne modifient en rien la réponse de la pyridoxine . Il en est de même des deux produits dont nous avons parlé précédemment : nipagine et nipasol .

b) Par contre, lorsque la même réaction est effectuée en présence de vitamine C , il ne se produit aucune coloration , sans doute à cause de la nature réductrice de l'acide ascorbique . Cette constatation avait déjà été faite par HOCHBERG et coll. (39) . Ces auteurs rapportent que pour inhiber totalement la réaction de 10 gamma de pyridoxine, 2 mg d'acide ascorbique sont nécessaires . Ces deux vitamines se trouvant

associées au sein de nombreux médicaments . Nous avons envisagé les moyens utilisables pour supprimer l'action inhibitrice de la vitamine C sur le développement de la réaction à la 2-6 dichloroquinone-chlorimide .

Si pyridoxine et acide ascorbique peuvent être séparés par l'emploi d'absorbants, la méthode la plus couramment employée consiste en l'oxydation de la vitamine C . HOCHBERG et coll. (39) préconisent de traiter la préparation par du bioxyde de manganèse en milieu alcalin au bain-marie bouillant . CARPENTER et coll . (16) étudiant la stabilité de la pyridoxine sous différents agents chimiques ou physiques , n'ont observé aucune action du bioxyde de manganèse par opposition à certains oxydants tels que le permanganate de potassium ou l'eau oxygénée qui détruisent la vitamine B_6 .

Nous avons essayé d'appliquer cette méthode à une spécialité contenant de la vitamine C : l'Hydrosol B. O. N. polyvitaminé (Roche) . Nous avons obtenu des résultats inconstants, compte tenu des quantités de bioxyde de manganèse mises en jeu, ainsi que des temps de chauffage plus ou moins prolongés . D'autre part, l'emploi d'un produit en poudre tel que le bioxyde de manganèse nécessite après l'oxydation, une filtration soigneuse qui complique la technique du dosage . Enfin, nous avons pu observer une légère modification de l'allure spectrale (λ max = 650 mμ) pour une préparation ayant subi l'action du bioxyde de manganèse par rapport au spectre d'une réaction normale (λ max = 645 mμ) . C'est pourquoi nous avons voulu essayer un oxydant de manipulation plus aisée et sans action inhibitrice sur la réaction colorée entre la vitamine B_6 et la D. C. Q. C. Le permanganate de potassium et l'eau oxygénée n'étant pas utilisables, nous nous sommes adressé à l'Iode .

D / OXYDATION DE LA VITAMINE C PAR L'IODE

La première expérimentation a été réalisée de la manière suivante :

Nous avons suivi sur le plan de la cinétique simultanément deux réactions :

- l'une réalisée sur la vitamine B_6 seule, d'après le protocole précédemment décrit .

- l'autre en présence de vitamine C, la préparation ayant été traitée par de l'iode normale .

La quantité d'iode nécessaire peut être facilement déterminée de la manière suivante :

- si la solution est limpide, ajouter goutte à goutte la solution d'iode jusqu'à coloration brune persistante . Tout l'acide ascorbique se trouve alors oxydé .

- si la préparation est déjà colorée, on peut faire une détermination préalable de la quantité d'iode nécessaire en réalisant l'oxydation sur une solution d'acide ascorbique préparée artificiellement et de concentration identique à celle de la préparation étudiée . On ajoutera à celle-ci la quantité ainsi déterminée .

En opérant sur un mélange contenant 1, 5ml de pyridoxine base à 10mg% et 1, 5ml d'une solution d'acide ascorbique à 250mg %, 0, 52ml d'iode , 0, 05 N ont été nécessaires pour réaliser une oxydation complète . La réaction colorée pratiquée ensuite a conduit aux résultats suivants : (figure n° 21)

a) Les allures spectrales des deux réactions sont identiques : le maximum d'absorption se situe dans les deux cas à 645 mμ .

b) Les cinétiques des deux réactions sont comparables pendant les vingt premières minutes .

c) Après vingt minutes, on assiste à une chute très rapide de le coloration pour la réaction effectuée en présence de vitamine C. Cette coloration devient pratiquement nulle après soixante minutes . Tout se

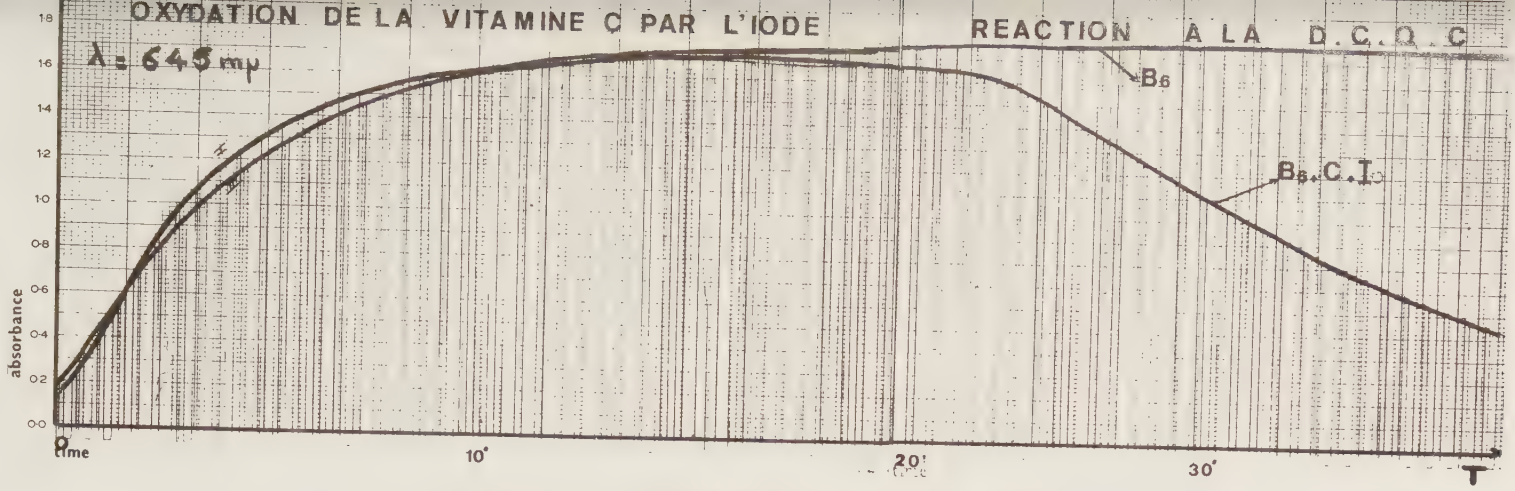


Figure n° 21 - Oxydation de la vitamine C par l'iode.

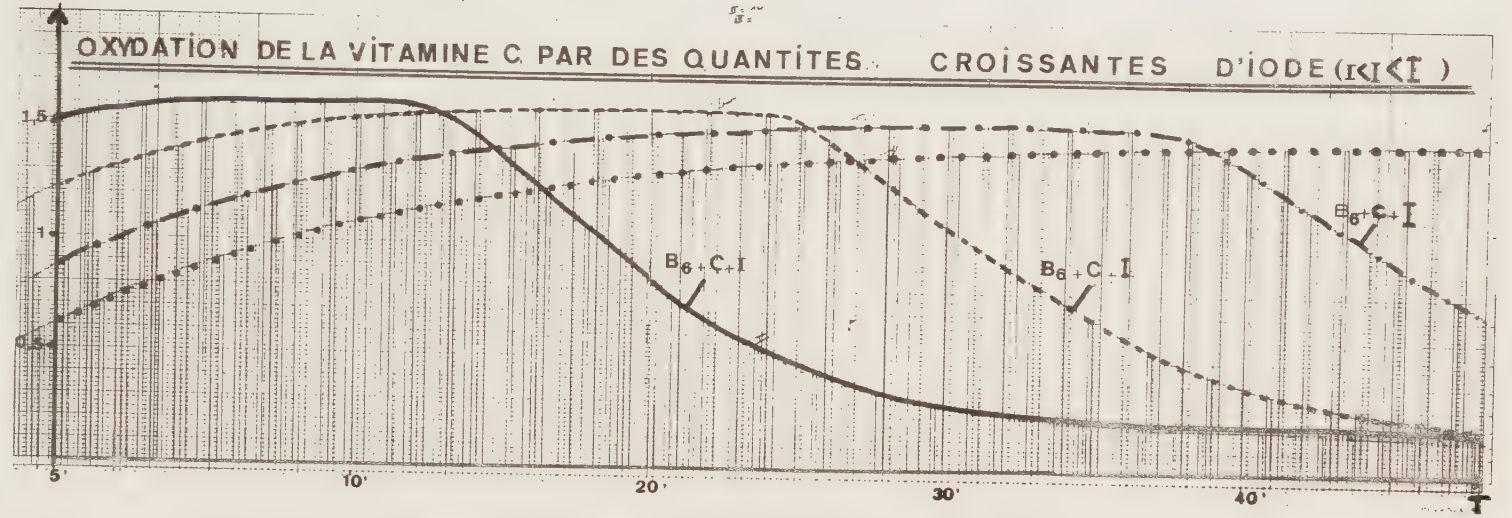


Figure n° 22 - Oxydation de la vitamine C par des quantités

passe comme si la réaction d'oxydation était réversible et comme si l'acide ascorbique retrouvait son caractère réducteur inhibant de nouveau la réaction colorée .

- Pour étudier ce phénomène, nous avons alors réalisé quatre réactions avec un même réactif à la 2-6 dichloroquinone-chlorimide,des quantités identiques de pyridoxine et d'acide ascorbique , mais des concentrations croissantes d'iode . Nous avons pu remarquer dans ces conditions que : (figure n°22)

- Plus la quantité d'iode ajoutée est importante, plus la cinétique de la réaction est retardée .

- La valeur atteinte au maximum de coloration est voisine dans tous les cas .

- La chute de l'intensité de la coloration observée précédemment est retardée au fur et à mesure que l'on augmente la quantité d'iode mise en jeu .

En résumé, le fait d'opérer en présence d'un excès d'iode ne modifie pratiquement pas la durée du plateau de stabilité de la réaction colorée : en effet, le retard observé dans l'établissement du maximum de la coloration est compensé par un retard de sa disparition . On observe une translation dans le temps de l'ensemble de la réaction .

Dans un deuxième temps, pour une concentration identique en iode, nous avons fait varier la concentration du réactif à la D. C. Q. C. Quatre réactifs différents ont ainsi été employés en solution dans le butanol : 250 - 500 - 750 et 1000mg par litre . Dans ces conditions, les vitesses de développement de la coloration sont similaires mais, la chute de la coloration n'est observée qu'avec le réactif d'une concentration de 250mg par litre . Les trois autres réactifs nous ont donné des réactions parfaitement stables pendant 45 minutes à une heure .

L'interprétation théorique de l'ensemble des processus réactionnels est présentée dans le tableau n°6.

1°- La condensation de la 2-6 dichloroquinone-chlorimide avec la pyridoxine conduit dans les conditions normales à la formation d'un indophénol bleu qui se décompose lentement en donnant la pyridoxine et le dérivé hydroxylé de la dichloroquinone-chlorimide : cette quinone-oxime possède une forme tautomère nitrosophénol . La coloration de l'indophénol est sous la dépendance d'une part du pH, d'autre part, du potentiel d'oxydo-réduction du milieu réactionnel . En effet, en milieu acide la coloration bleue fait place à une coloration rose; en présence d'un réducteur l'indophénol bleu conduit à un leucodérivé .

2°- L'acide ascorbique manifeste une influence à deux niveaux :

a) Il empêche (réaction I) la réaction de condensation , c'est-à-dire la formation de l'indophénol . Ce blocage est dû à son pouvoir réducteur . En effet, dans une expérience de contrôle, nous avons laissé en contact dans les conditions normales de laréaction la dichloroquinone-chlorimide, la pyridoxine et la vitamine C pendant une durée correspondante à la formation de l'indophénol . Au bout de ce temps, une oxydation par un excès d'iode ne développe aucune coloration . Par contre , si l'on introduit un très gros excès de dichloroquinone chlorimide (réactif 10 fois plus concentré que le réactif normal): celle-ci oxyde l'acide ascorbique en acide déhydroascorbique et le produit coloré se forme . Il n'est cependant pas possible d'utiliser ce procédé pour éliminer l'action inhibitrice de l'acide ascorbique car le blanc réactif présente lui-même une absorption considérable .

b) Il est capable , lorsque l'indophénol est formé de le transformer par réduction en son leucodérivé (réaction II) .

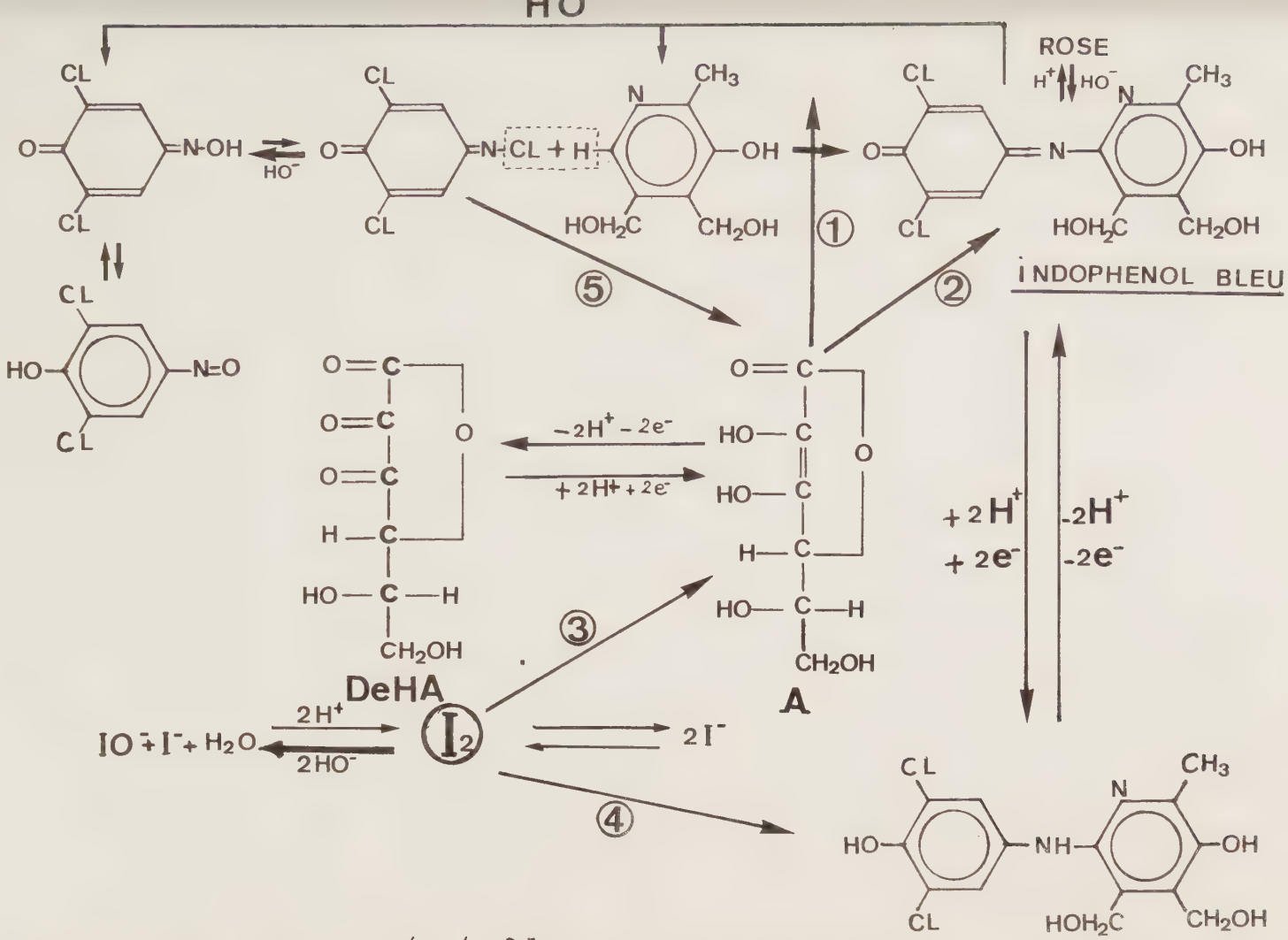


Tableau VI : Oxydation de la Vitamine C par l'Iode

3°- Nous avons donc utilisé pour éliminer l'influence de l'acide ascorbique, l'action de l'iode en milieu légèrement acide . Dans ces conditions ,2,40mld'iode 0,05 N sont nécessaires pour oxyder un mélange contenant 5ml de vitamine C à 250 mg% et 5ml de vitamine B_6 à 10 mg% . Cette action est immédiate (réaction III). Cependant lorsque après cette réaction l'on développe la réaction à pH légèrement alcalin, le milieu réactionnel aquiert lentement un potentiel d'oxydo-réduction tel qu'au bout d'un certain temps , l'indophénol est réduit en son leuco-dérivé . Ce leuco-dérivé est facilement et instantanément reconverti en indophénol par addition au milieu d'un excès d'iode (Réaction IV). Si l'on a eu soin d'introduire cet excès d'iode avant de développer la réaction colorée ou encore si l'on prend soin d'opérer avec la quantité théorique d'iode mais avec un excès de D. C. Q. C. qui elle-même possède un caractère oxydant (réaction V) , la réduction de l'indophénol n'apparaît pas .

D'autre part, la quantité théorique d'iode titrée nécessaire pour neutraliser une quantité déterminée d'acide ascorbique est différente selon que l'on opère en milieu acide ou en milieu alcalin . En milieu acide , nous avons affaire à un couple iode-iodure, en milieu alcalin au contraire c'est le couple hypoiodite IO^- - I^- qui apparaît . Si donc on réalise l'oxydation de la vitamine C en milieu tampon Véronal et non plus en milieu acide , 3, 30 ml d'iode 0, 05 N sont nécessaires pour un mélange constitué de 5ml d'acide ascorbique à 250mg % et de 5ml de vitamine B_6 à 10mg % .

En conclusion, pour réaliser l'oxydation de la vitamine C dans les spécialités contenant de la vitamine B_6 , on peut opérer dans les conditions suivantes :

- Utilisation d'une quantité d'iode légèrement supérieure à la quantité théoriquement nécessaire . Cette iode sera utilisée sous la forme d'une solution décinormale.

- Emploi d'un réactif à la dichloroquinone chlorimide à 500mg par litre dans du butanol .

- Introduction dans le blanc et dans l'étalonnage (B_6 seule) des quantités d'iode équivalentes à celles utilisées dans le dosage .

- La lecture sera effectuée à 645 mμ entre 20 et 25 minutes après le lancement de la réaction colorée selon le protocole opératoire classique .

Nous avons appliqué cette technique aux ampoules de Pyridoscorbine , contenant une association de vitamine B_6 et de vitamine C . Les résultats ont été très satisfaisants .

CHAPITRE III

APPLICATIONS AUX MEDICAMENTS: METHODES AUTOMATIQUES

°°°

Le dosage automatique de la vitamine B_6 en colorimétrie a déjà fait l'objet de quelques publications . C'est ainsi que, TSUDA et coll. (86) appliquent à l'auto-analyse la méthode colorimétrique utilisant la diéthylpa-raphénylènediamine (77), en présence de ferricyanure de potassium . La coloration obtenue est extractible par le chloroforme . Cette application ne s'est pas faite sans difficulté : l'instabilité du réactif utilisé rend notamment cette méthode difficilement applicable . KHOURY (45) (46) (47) applique la méthode à la D. C. Q. C. avec un réactif en solution dans l'isopropanol et en tampon chlo-rure d'ammonium-ammoniaque dont nous avons déjà par-lé précédemment et discuté des inconvénients . STEINER et coll. (76) appliquent également cette réaction pour le dosage de la pyridoxine en association avec la thiamine dans des médicaments .

Nous avons essayé de transposer la technique précédemment décrite au domaine de l'analyse automati-que pour laquelle il y a lieu de distinguer :

- d'une part l'analyse des formes liquides (ampoules, gouttes, sirops ..... etc)
- d'autre part l'analyse des formes solides (compri-més, dragées, gélules, poudres ..... etc .)

I - DOSAGE AUTOMATIQUE DE LA PYRIDOXINE par la réaction à la 2-6 dichloroquinone-chloromide dans les formes médicamenteuses liquides .

A / MATERIEL, REACTIFS, ECHANTILLONNAGES

1°- Matériel

Auto-analyser Technicon :

- un distributeur d'échantillons "Sampler II"
- une pompe proportionnante
- un colorimètre (filtres 645 mμ)
- un enregistreur .

2°- Réactifs

- Solution tamponnée de travail

. tampon éthanolique . Mélanger 200ml de tampon véronal-acétate-HCl de pH =7, 60 décrit précédemment, avec 600ml d'éthanol absolu .

- Réactif à la D. C. Q. C.

Ce réactif est identique à celui précédemment décrit .

3°- Echantillonnages

a) Etalonnage

L'auto-analyser permettant des lectures de densités optiques relativement faibles (de l'ordre de 0, 10 à 0, 20) la méthode est plus sensible en voie automatique qu'en voie manuelle .

Préparer une solution mère de pyridoxine base à 10mg% dans l'eau bi-distillée . A partir de cette solution, réaliser les dilutions suivantes :

Solution mère 10 mg %	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml
Eau bi-distillée Q.S.P.	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
Concentration en pyridoxine base mg °/oo	5	10	15	20

b) Les différentes formes pharmaceutiques ont été diluées de manière à obtenir des concentrations entrant dans la gamme d'étalonnage .

Nous rapportons les résultats obtenus avec le "becozyme" sous différentes formes dont la composition est représentée dans le tableau suivant :

	BECOZYME gouttes	*BECOZYME ampoules*	*BECOZYME sirop*
Vitamine B_6	200 mg	200 mg	40 mg
Thiamine	500 mg	500 mg	100 mg
Riboflavine	200 mg	200 mg	40 mg
Nicotinamide	2 g	2 g	400 mg
Panthénol	300 mg	300 mg	60 mg
Composition pour 100 millilitres			

B6. D.C.Q.C. FORMES LIQUIDES

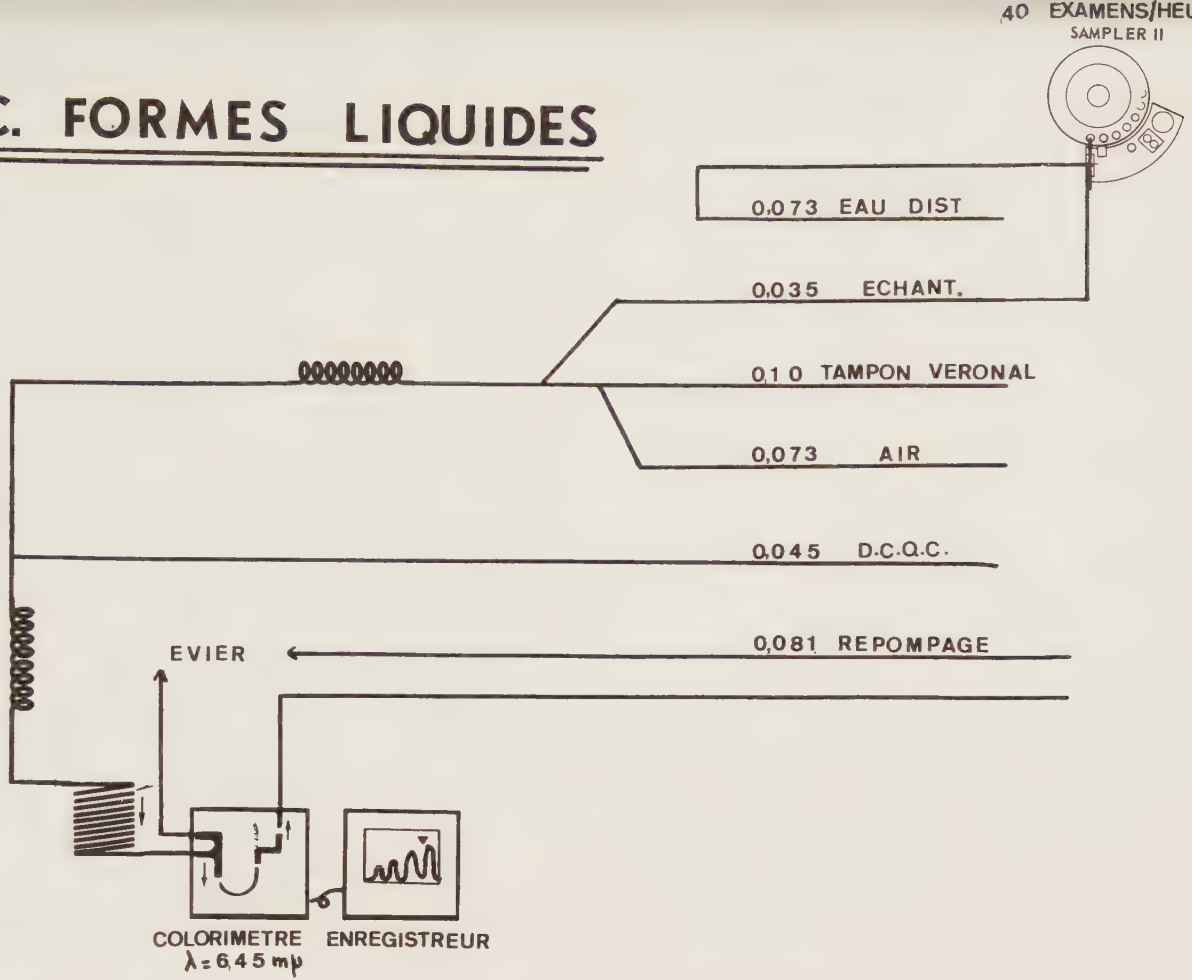


Figure n° 23 - Réaction à la D.C.Q.C. Manifold pour les formes liquides.

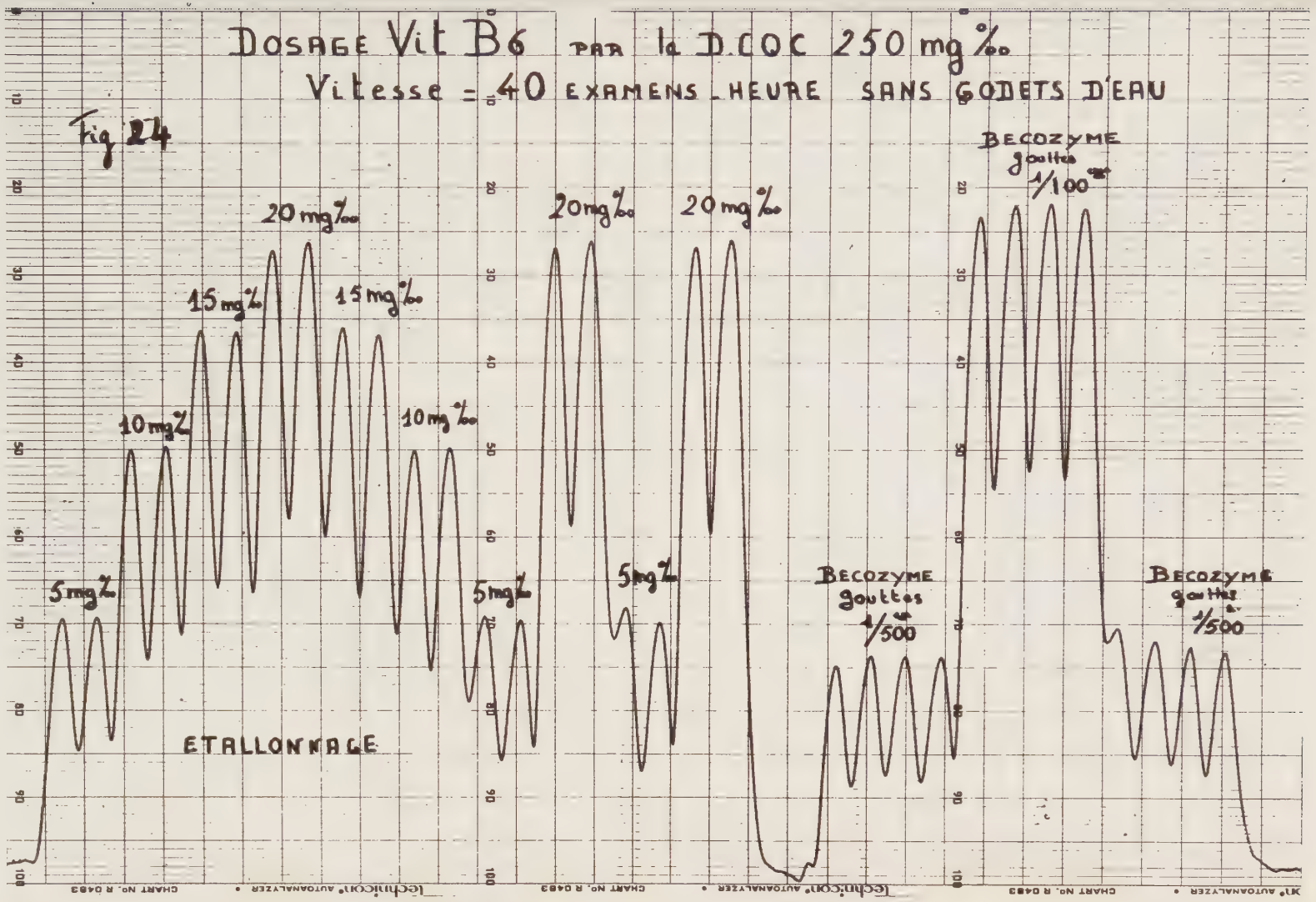
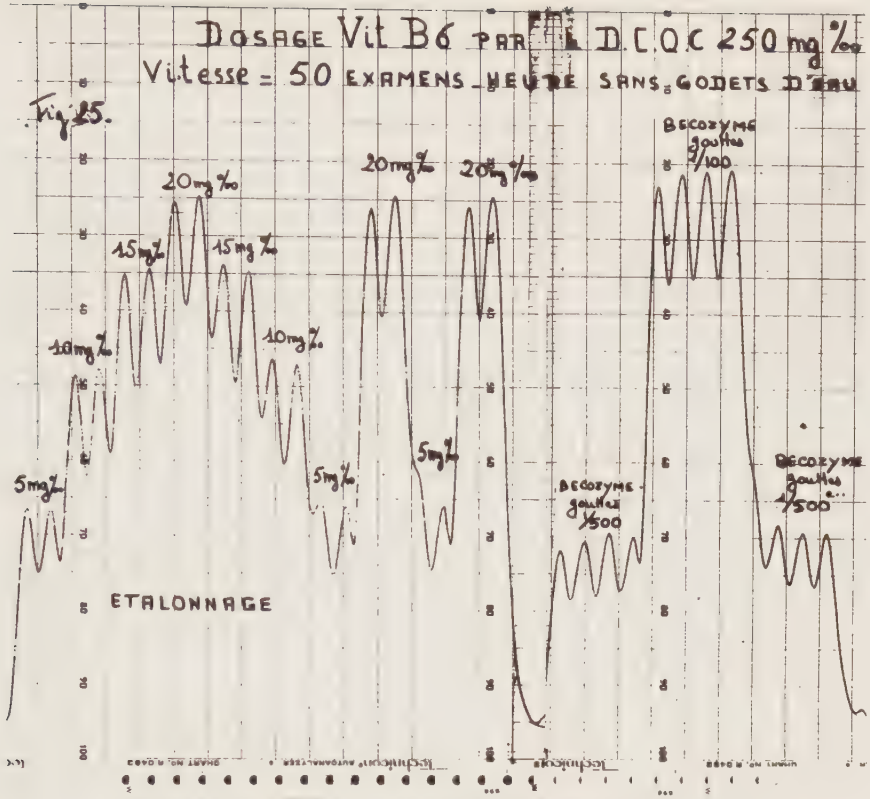


Figure n° 24 - Dosage automatique de formes liquides. 40 examens/heure



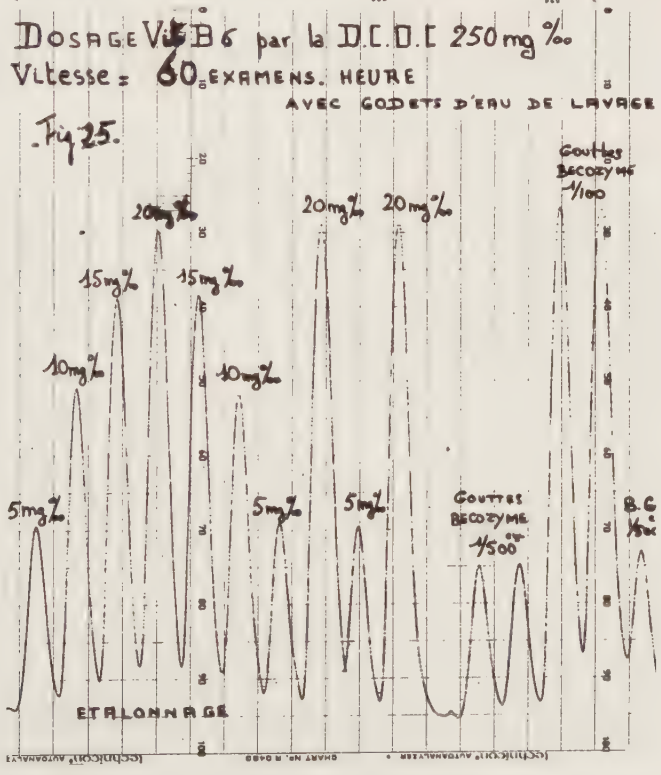


Figure n° 25 - Dosage automatique de formes liquides. Différentes vitesses
Différentes vitesses.

B / MANIFOLD

Le schéma du manifold, extrêmement simple, est représenté sur la figure n°23 . Les tubes pompant le tampon éthanolique , la D. C. Q. C. et le tube assurant le repompage sont en solvaflex . L'échantillon segmenté par de l'air est dilué dans le tampon Véronal de pH = 7,60 . Après mélange, le réactif à la dichloroquinone chlorimide est introduit; après une nouvelle bobine de mélange, une bobine de délai d'environ 15 minutes permet à la réaction d'atteindre son plateau de stabilité , la lecture est effectuée à 645mμ dans la cuve à flux continu du colorimètre .

C / RESULTATS

1°- Les résultats que nous avons obtenus avec les gouttes de bécozyme sont représentés dans la figure n° 24 .

a) Vitesse :

En ce qui concerne la cadence de travail, les figures 24 et 25 représentent des enregistrements réalisés à différentes vitesses : 60 examens/heure , avec un godet d'eau de lavage intercalé, 50 et 40 examens/heure, avec un godet d'eau de lavage intercalé, 50 et 40 examens/heure sans godet d'eau de lavage . On peut remarquer que :

- A 50 examens/heure ,

La contamination d'un dosage à l'autre est assez importante et ne permet pas d'effectuer des dosages dans des conditions satisfaisantes .

- A 40 examens/heure ,

le résultat est déjà bien meilleur puisque la contamination produite sur un étalon de faible concentration (0, 5mg%) arrivant juste après un étalon de forte concentration (2mg%) , n'excède pas 7% .

- La meilleure cadence de travail nous paraît être 60 examens / heure avec un godet d'eau de lavage ce qui représente une cadence réelle de travail de 30 examens/ heure . En effet, dans ce cas l'expérience précédente répétée montre une contamination tout à fait négligeable .

b) Reproductibilité :

Des enregistrements répétés, effectués sur une même dilution de gouttes de bécozyme ont montré que le montage proposé permettait de donner des résultats à plus ou moins 1% près .

2°- Cas particulier

Le dosage ainsi réalisé sur le bécozyme sirop nous a posé quelques problèmes . Ce sirop, dilué au 1/5 dans de l'éthanol laisse précipiter une proportion importante de saccharose . Ce traitement est nécessaire pour éviter une trop grande viscosité du liquide, source de contamination . La solution alcoolique filtrée est à nouveau diluée au 1/4 et au 1/8 dans de l'eau bi-distillée, de manière à obtenir des concentrations de 20 et 10mg pour mille .

Le dosage automatique réalisé sur ces deux dilutions nous a conduit à des résultats aberrants : paradoxalement, c'est la solution la plus diluée qui donnait le pic le plus important . Après vérification de ce résultat, nous avons effectué parallèlement à la courbe d'étalonnage une courbe de dilution sur le médicament dans les mêmes conditions de concentration (Figure n°26) . Cette figure montre , jusqu'à une concentration de 7, 50mg% o une réponse normale par rapport à l'étalonnage . Au-delà de cette concentration la proportionnalité n'est plus respectée .

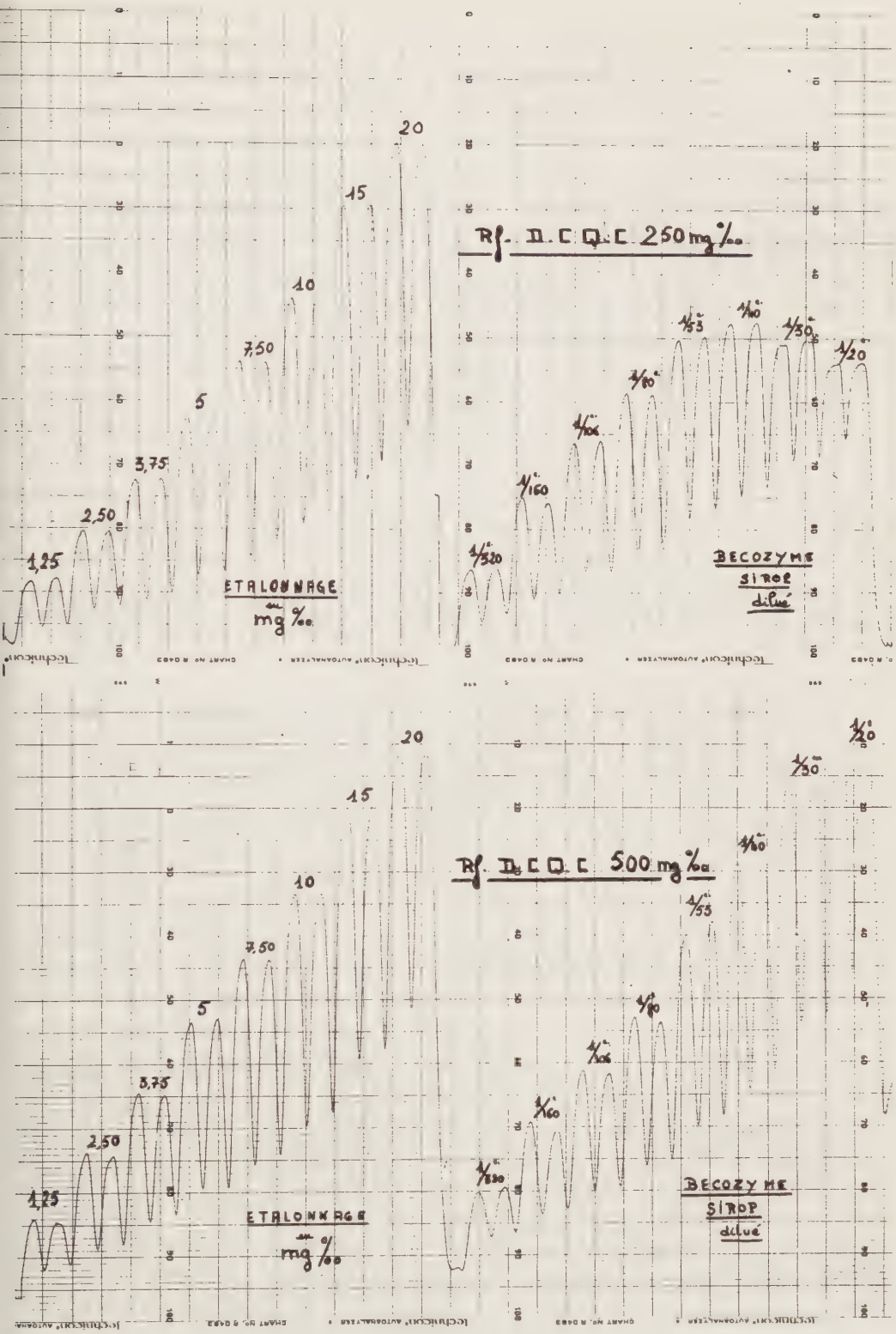


Figure n° 26 - Enregistrements réalisés sur le "Bécozyme Sirop"

Nous avons pensé à un phénomène de compétition dans la consommation en D. C. Q. C. sans en déterminer la nature, ni la cause . S'il en était ainsi, cet obstacle devait être levé en augmentant la concentration en D. C. Q. C. Avec un réactif deux fois plus concentré nous avons retrouvé une réponse tout à fait normale .

D / REMARQUES

- L'oxydation de la vitamine C par l'iode est également possible en voie automatique , il suffit en effet d'ajouter un tube de pompe qui amènera la solution oxydante d'iode décinormale .

- Pour éliminer les interférences, il suffit d'effectuer une première série de dosages selon la technique classique puis une deuxième série avec une solution borique tamponnée et d'effectuer la différence entre les deux lectures .

II - DOSAGE AUTOMATIQUE DE LA PYRIDOXINE par la réaction à la 2-6 dichloroquinone-chlorimide dans les formes solides .

A / MATERIEL , REACTIFS, ECHANTILLONNAGES

1°- Matériel

Le même matériel que pour les formes liquides est nécessaire mais le distributeur d'échantillons " Sampler II" est remplacé par un échantillonneur de solides : le "Solid-Prep" (figure n°27) . Cet appareil réalise automatiquement les différentes manipulations nécessaires à la mise en solution des formes médicamenteuses solides (comprimés, dragées, poudres, gélules, etc ·····) Plusieurs opérations programmées dans le temps s'effectuent automatiquement .

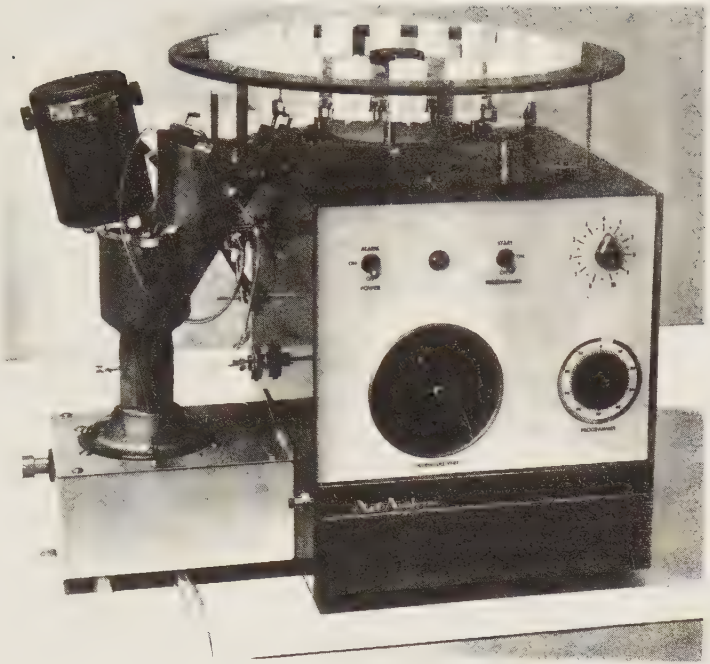
a) Introduction périodique des échantillons dans un volume V de dilution que l'utilisateur peut faire varier entre 50 et 200ml ; la nature du liquide de dilution peut également varier (acides, bases, solvants organiques , etc ·····)

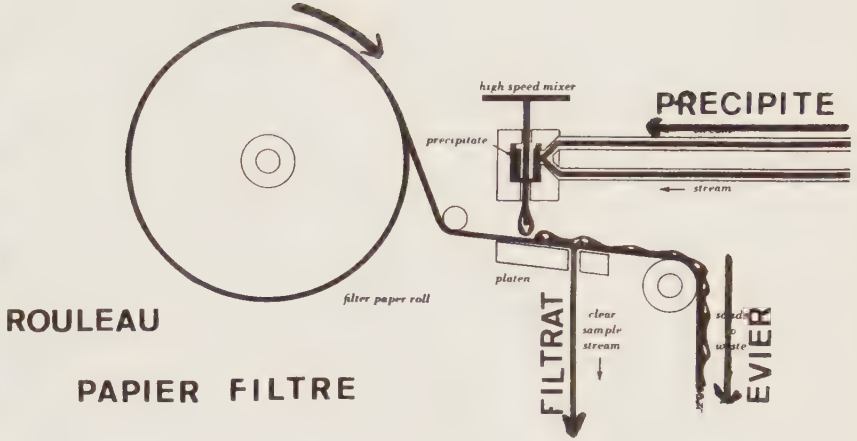
b) Broyage et homogénisation de la forme solide assurant ainsi sa mise en solution .

c) Rinçage du godet ayant contenu la forme solide .

d) Prélèvement d'une fraction aliquote déterminée pour le dosage .

e) Evacuation de la fraction non utilisée vers l'évier .





"SOLID-PREP" FILTRE CONTINU

Figure n° 27 - Solid-Prep et Filtre continu

f) Rinçage de l'ensemble de l'appareil .

g) Evacuation des eaux de rinçage vers l'évier.

h) Prélèvement d'un nouveau volume V pour le dosage suivant .

D'autre part, si on n'aboutit pas à une solubilisation complète des principes et des excipients, on peut adapter en sortie un appareil assurant une filtration continue (figure n°27) . A la sortie du broyeur , le liquide contenant le précipité est introduit dans une chambre où il subit une homogénisation ; il est ensuite déversé d'une manière continu sur une bande de papier filtre qui se déroule à une vitesse constante . De l'autre côté de la bande de papier filtre, un tube de calibre approprié au dosage aspire le liquide ainsi clarifié . La vitesse du déroulement du filtre est réglée suivant l'importance du précipité, et d'après le volume nécessaire à la réaction (problèmes de sensibilité) . Pour éviter la contamination, à la sortie du "Solid Prep", l'échantillon liquide prélevé est segmenté par de l'air et un système de valve programmé permet le shunt du prélèvement pendant les périodes a, b, c, d, e, f, g, h ; pour maintenir constant le débit des flux et assurer le rinçage entre les échantillons, le solvant arrive par un tube de pompe au système de valve .

2°- Réactifs

Les réactifs sont identiques à ceux décrits pour le dosage dans les formes liquides . Le liquide de dilution à introduire dans le "Solid Prep" est de l'eau bidistillée .

3°- Echantillonnage

- Les solutions habituellement utilisées, sont ici remplacées par des étalons en poudre . Nous avons employé, pour notre part, 100, 150, 200, 250 et 300mg de chlorhydrate de pyridoxine que l'on répartit en godets .

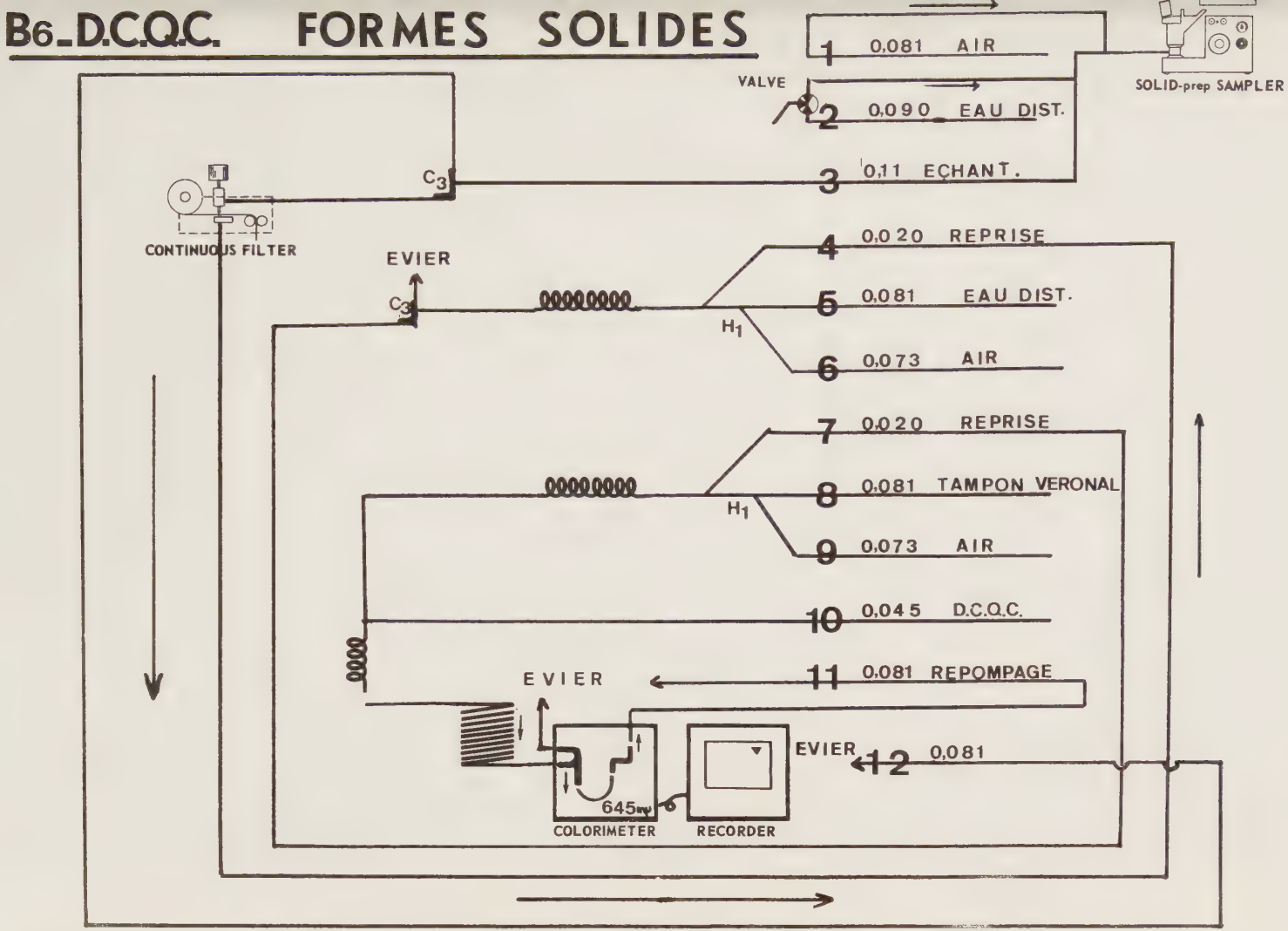


Figure n° 28 - Réaction à la D.C.Q.C. Manifold pour les formes solides.

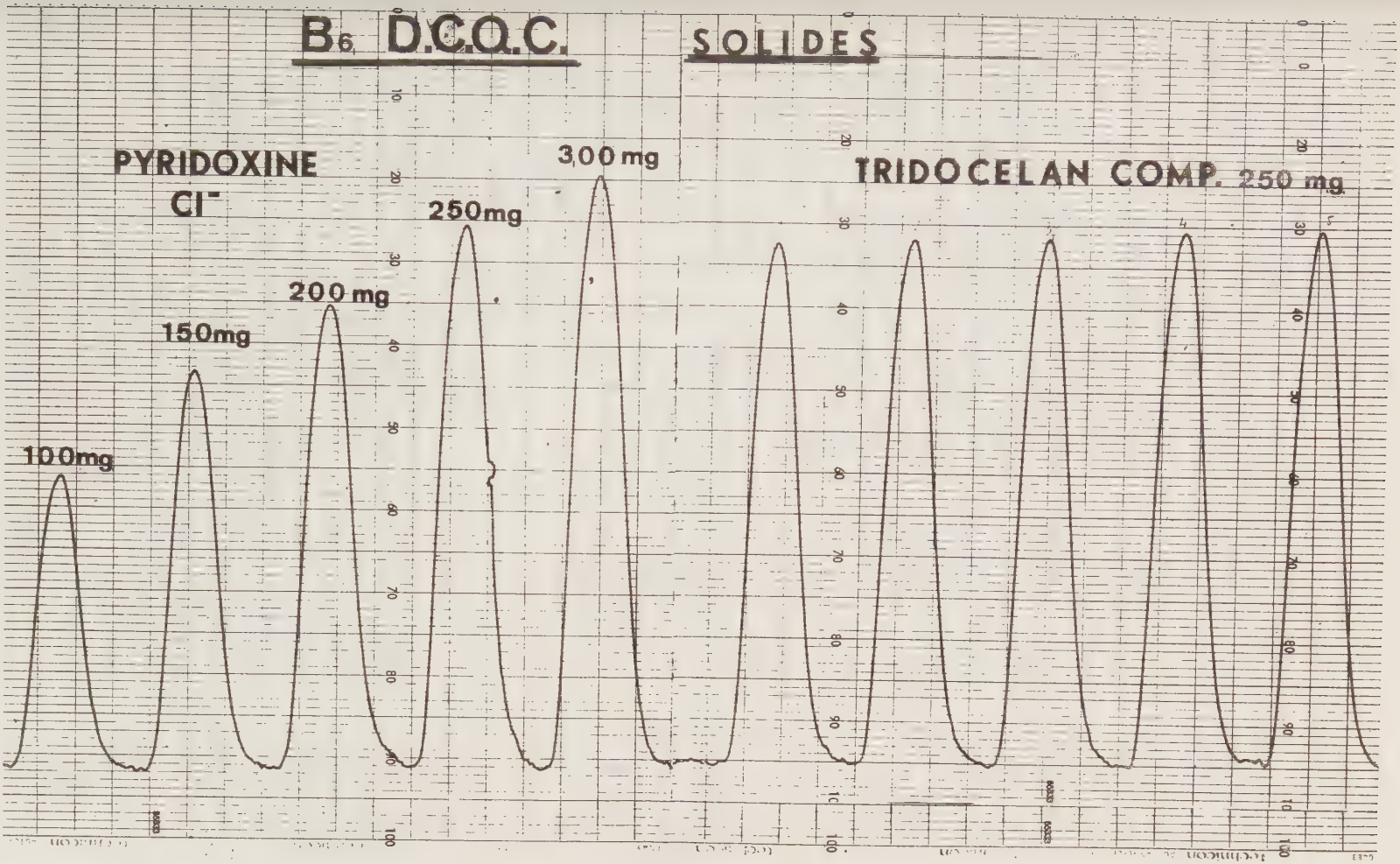


Figure n° 29 - Dosage automatique de formes solides.
Réaction à la D.C.Q.C.

- Les formes solides médicamenteuses ne subissent aucun traitement et sont mises directement en godets .

B / MANIFOLD

Le schéma du manifold que nous avons utilisé est représenté sur la figure n°28 . Comme pour les formes liquides, les tubes pompant le tampon éthanolique et la D. C. Q. C. , sont en solvaflex, ainsi que le tube de repompage . Le volume du liquide de dilution est programmé à 200ml . Après filtration, le prélèvement est dilué dans de l'eau bi-distillée avant d'effectuer la réaction dans les conditions normales .

C / RESULTATS

La figure n° 29 montre un étalonnage et des enregistrements réalisés sur des comprimés de Tridocélan, comprenant 100mg de thiamine, 250mg de pyridoxine et 250 microgrammes de vitamine B12 , sous forme d'hydroxocobalamine . Pour une vitesse réelle de 20 examens/heure, on peut y voir l'excellente reproductibilité , d'un examen à l'autre .

D / REMARQUES

Pour éliminer les interférences, on peut à la sortie du filtre continu diviser le flux d'échantillonnage en deux au moyen de tubes de débit identique : le premier tube entrera dans le circuit classique du manifold précédemment décrit (figure n°28) . Le second tube entrera dans un circuit identique quant à son montage, ne différant que par le remplacement de l'eau bi-distillée par une solution borique tamponnée après avoir dressé une courbe d'étalonnage avec l'eau bi-distillée . Le matériel nécessaire à un tel montage comporte :

- la substitution de la pompe normale par une pompe vingt tubes .
- la mise en jeu d'un autre couple photocolorimètre - enregistreur .

L'oxydation de la vitamine C a pu être réalisée par KHOURY (45) . Cet auteur place dans la cupule contenant le médicament , 1g de bioxyde de manganèse en poudre dans le petit compartiment latéral de la cupule. Le liquide de dissolution est de la soude 0, 5 N; le chauffage est assuré à la sortie du "Solid Prep" par passage au bain-marie à 95° C. Après refroidissement et dialyse, on peut alors effectuer la réaction colorée . Le remplacement, comme agent d'oxydation de l'acide ascorbique, du bioxyde de manganèse par une solution titrée d'iode offre sur la méthode précédente des avantages pratiques indiscutables . La réaction s'effectue en phase liquide , à la température ambiante et instantanément .

Au terme de cette deuxième partie, on peut tirer les conclusions suivantes :

La réaction à la 2-6 dichloroquinone-chlorimide est particulièrement indiquée pour le contrôle analytique de la vitamine B_6 dans les spécialités pharmaceutiques simples ou polyvitaminées : elle présente en effet grâce aux moyens que possède l'analyste de contrôler les interférences éventuelles, une bonne spécificité; facile à mettre en jeu, d'une excellente sensibilité elle est susceptible d'adaptations entièrement automatiques aussi bien pour le contrôle des formes liquides que pour celui des formes solides .

TROISIEME PARTIE

SPECTROPHOTOMETRIE ULTRAVIOLETTE DES VITAMINES B_1 , B_6 et B_{12}

La fréquence des associations vitaminiques B_1 , B_6 et B_{12} dans les spécialités pharmaceutiques , et l'absorption de ces trois molécules dans le domaine du spectre ultra-violet nous ont conduit à envisager cette méthode pour le contrôle analytique de ces trois principes .

Après un bref rappel historique sur les méthodes de contrôle des vitamines B_1 et B_{12} (chapitre I), l'étude expérimentale des spectres ultra-violets constituent un second chapitre . Dans le chapitre III est développé l'intérêt analytique de cette étude tandis que les chapitres IV et V sont respectivement consacrés aux applications manuelles et automatiques dans le contrôle des médicaments .

°°°

CHAPITRE I

RAPPEL DES DIFFERENTES METHODES DE DOSAGE DES VITAMINES B_1, B_6 et B_{12}

°°°

A / VITAMINE B_1

En dehors des méthodes microbiologiques (69) (20) (15) (88), et de la titrimétrie en milieu non aqueux (17) (49) (65) (63) diverses techniques sont utilisées :

a) Méthodes gravimétriques
utilisant la précipitation sous forme de :

- silicotungstate (7)
- de reineckate (5) .

b) Méthode polarographique (66)

c) Méthodes colorimétriques

1- mettant en jeu la copulation avec les composés suivants : -p. aminoacétophénone (39) (27) (54) : cette méthode a fait l'objet d'applications aux spécialités pharmaceutiques par AUERBACH (3) dans les ampoules, et par BALLARD (4) dans des tablettes après extraction à une température de 50° par de l'éthanol à 50% .

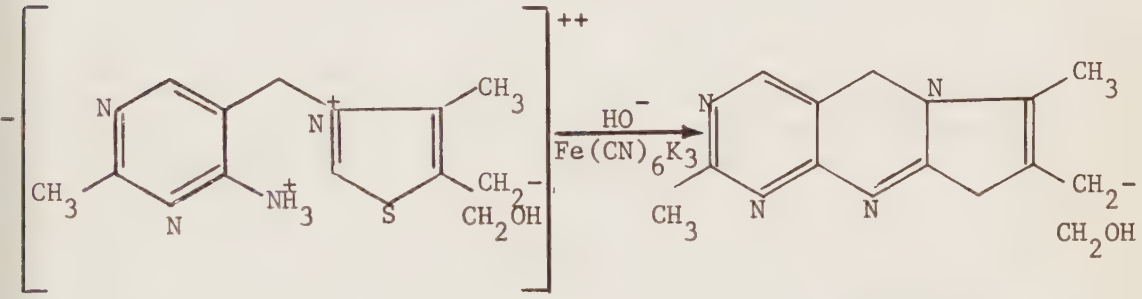
. 6 aminothymol diazoté (35)
. 2-4 dichloroaniline (90)
. éthyl p. trichloroacétaminobenzoate (48)
. 2 p. aminophénylsulfamidopyridine (56)
. P. diméthylaminobenzaldehyde (61) .

. acide aminoaphtosulfonique (32)
. 2-6 dibromoquinone chlorimide (68)

2- Faisant intervenir le noyau diazoté
. Bromure de cyanogène (84) .

d) Méthode fluorométrique (42)

C'est actuellement le plus utilisée . Elle est basée sur l'oxydation de la thiamine en thiochrome par le ferricyanure de potassium en milieu alcalin . Le dérivé d'oxydation possède une fluorescence bleue intense dont la mesure est effectuée à 436 mμ . Le mécanisme de la réaction est le suivant :



THIAMINE — THIOCHROME

Cette méthode a fait l'objet de très nombreuses mises au point (9) (79) (89) (18) . Cependant cette technique conduit à des résultats dont la reproductibilité est loin d'être parfaite (de l'ordre de ± 5 à 10%) . C'est pourtant la méthode de beaucoup la plus utilisée pour le dosage de la vitamine B_1 dans les médicaments polyvitaminés . En outre, elle a fait l'objet d'applications aux médicaments en voie automatique (8) (87) .

B / VITAMINE B_6

Les différentes méthodes ont été rappelées précédemment (introduction) .

C / VITAMINE B_{12}

En dehors des techniques microbiologiques (25) (41) (85), il existe différentes méthodes :

- Méthodes colorimétriques :
La coloration pourpre obtenue avec le cyanure de sodium en milieu alcalin (19) .

La détermination du groupe cyanure de la cyanocobalamine (11) dont DOWD et coll. (23) ont proposé une application en voie automatique .

- Méthode fluorométrique.
A côté de ces techniques souvent longues et délicates, dont la spécificité n'est pas la qualité première, il nous a paru intéressant d'essayer de préciser les possibilités de la spectrophotométrie U. V. dans ce domaine .

CHAPITRE II

ETUDE EXPERIMENTALE DES SPECTRES U. V. DES VITAMINES B_1, B_6 et B_{12}

°°°

A / MATERIEL-REACTIFS-PROTOCOLE EXPERIMENTAL

1°- Matériel

- Spectrophotomètre Unicam SP 800
- pH mètre Quéré thermostaté

2°- Réactifs

- Chlorhydrate de pyridoxine
- Chlorhydrate de pyridoxal
- Pyridoxal phosphate
- Chlorhydrate de pyridoxamine
- Chlorhydrate de thiamine
- Cyanocobalamine (1)
- Acétate d'hydroxocobalamine (2)

(1) Ce produit nous a été fourni gracieusement par MMrs GEORGET et PRIOLLAUD des Laboratoires PHOSMA que nous remercions bien vivement .

(2) Nous remercions Mr. MILLET des Laboratoires ROUSSEL qui nous a procuré ce composé .

- Acétate de sodium, $NaCH_3$, COO , $3H_2O$ R. P.
- Phosphate monopotassique R. P.
- Carbonate de sodium R. P.
- Bicarbonate de sodium R. P.
- Acide sulfurique R. P.
- Acide acétique R. P.
- Lessive de soude R. P.

Solutions tampons :

Ces différentes solutions ont été préparées de la manière suivante :

Tampons pH = 4 et 5

- Solution I = Acide acétique M/5 (1,2g%) dans l'eau bi-distillée .

- Solution II = Acétate de sodium M/5 (1,64 g%) dans l'eau bi-distillée .

pH	Solution I	Solution II
4	87 ml	13 ml
5	35 ml	65 ml

Tampons pH = 6 - 7 - 8

- Solution I = Na OH N/5

Cette solution peut être préparée par dilution au 1/48 de la lessive de soude R. P., dans l'eau bi-distillée et ajustée après titration ultérieure .

- Solution II = phosphate de potassium (2,72 g%) dans l'eau bi-distillée .

pH	Solution I	Solution II	Eau bi-distillée
6	2,85 ml	25 ml	Q. S. P. 100 ml
7	14,80 ml	25 ml	Q. S. P. 100 ml
8	23,40 ml	25 ml	Q. S. P. 100 ml

Tampons pH = 9 et 10

- Solution I = Carbonate de sodium M/5 (2,12g%) dans l'eau bi-distillée .
- Solution II = Bicarbonate de sodium M/5 (1,68g%) dans l'eau bi-distillée .

pH	Solution I	Solution II	Eau bi-distillée
9	2 ml	23 ml	Q. S. P. 100 ml
10	13,8 ml	11,3 ml	Q. S. P. 100 ml

Les pH inférieurs à 4 et supérieurs à 10 ont été obtenus à l'aide d'acide sulfurique N/10 et N et d'hydroxyde de sodium N/10 et N .

3°- Protocole opératoire

- Vitamine B_1

On prépare une solution mère à 10mg %. La solution de travail, obtenue par dilution au 1/4 de cette solution mère dans la solution tampon de pH désiré donne une concentration finale de 2,5 mg% .

- Vitamine B_6

Le même protocole opératoire est suivi .

- Vitamine B_{12}

Sous forme de cyanocobalamine ou d'hydroxocobalamine : on prépare une solution mère à 44 mg% . La solution de travail , obtenue par dilution au 1/4 de cette solution mère dans la solution tampon de pH désiré donné une concentration finale de 11 mg% .

Chaque lecture est effectuée en cuve de 1cm d'épaisseur contre un blanc différent pour chaque pH . Les spectres ont été réalisés pour tous les pH une minute après l'addition du tampon .

B / INFLUENCE DU pH SUR LES SPECTRES D'ABSORPTION

Cette étude a porté sur :

- le chlorhydrate de thiamine pour la vitamine B_1
- le chlorhydrate de pyridoxine, la pyridoxamine, le pyridoxal chlorhydrate et le pyridoxal phosphate pour la vitamine B_6 .
- la cyanocobalamine et l'acétate d'hydroxocobalamine pour la vitamine B_{12} .

1°- Vitamine B_1

La figure n° 30 montre que :

- en milieu acide , la thiamine présente un maximum d'absorption situé à 247mμ suivi d'un épaulement vers 260 mμ .

- pour des pH compris entre 4 et 10, on note deux maximum tout à fait distincts : l'un situé à 235, l'autre à 266 mμ .

- pour des pH supérieurs à 10 , l'allure spectrale est totalement modifiée : on voit apparaître deux maximums l'un assez intense à 235 mμ et l'autre qui a plutôt la forme d'un plateau centré sur λ = 340 mμ .

LHOEST (52) explique ces différents maximum d'absorption de la manière suivante :

- pour des pH compris entre 0 et 7 , toutes les courbes passent par deux points isobestiques : il y a donc deux formes en présence et il ne peut y en avoir que deux . Il y aurait passage progressif de la forme thiamine, responsable du pic à 247 mμ , à un équilibre qui résulterait de la scission de la vitamine en ses deux noyaux : pyrimidine et thiazol . Mais cette hypothèse est fragile , car nous avons là un système à trois constituants, donc une courbe au moins devrait s'écarter de deux points isobestiques . On préfère l'hypothèse d'une forme acide α qui se transforme sous l'influence du changement de pH en une forme neutre β pour lesquelles d'ailleurs aucune formule n'a été proposée .

- pour des pH inférieurs

. pH compris entre 7 et 9, il y aurait passage du sel neutre à une forme base .

. pour pH supérieur à 10, il y aurait ouverture du cycle thiazolique et apparition du radical -SH , caractérisé par une absorption intense à 235 mμ , que l'on retrouve en effet pour la vitamine B_1 dans de telles conditions de pH .

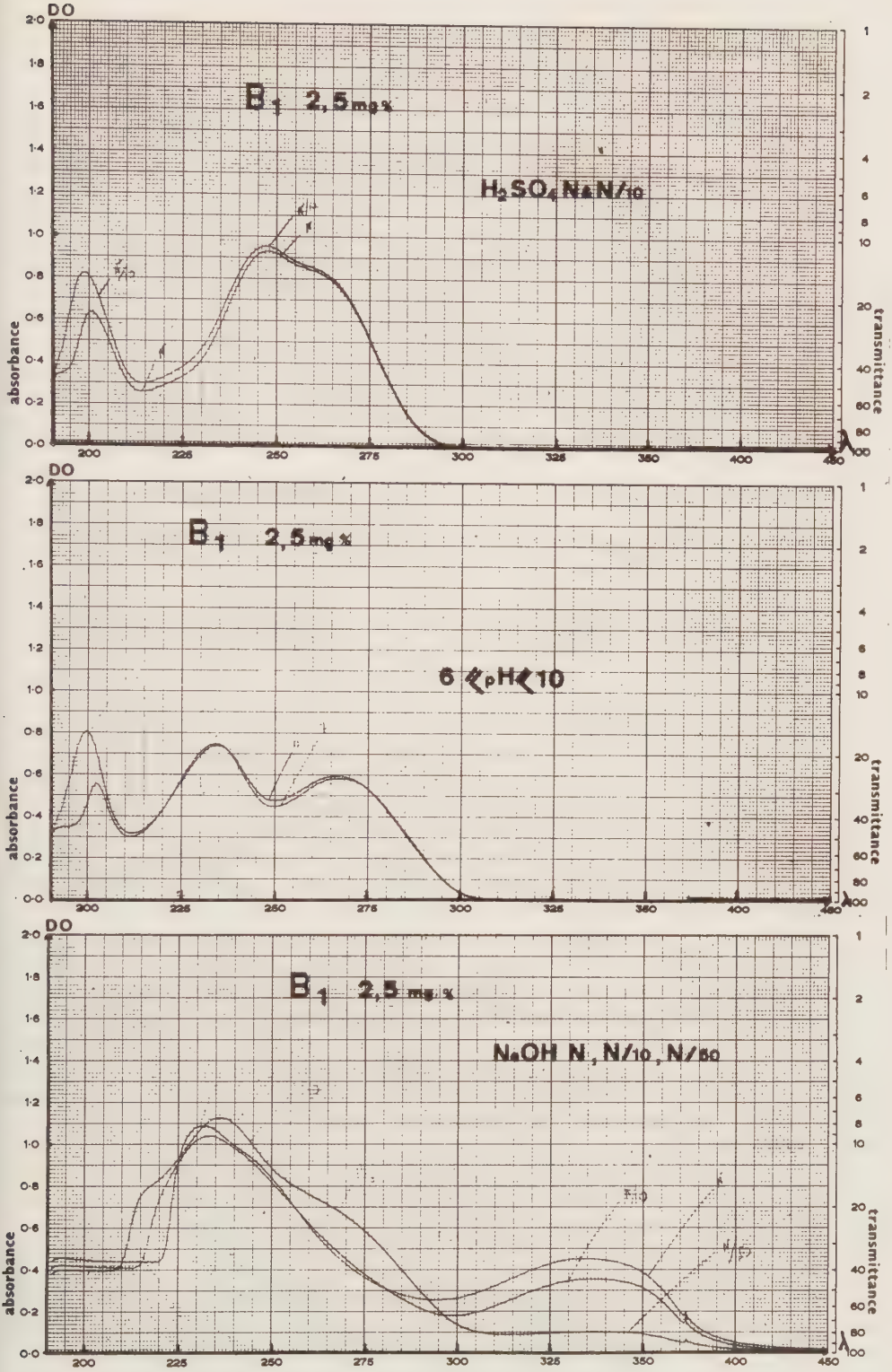


Figure n° 30 - Influence du pH sur le spectre U.V. de la vit. B_1
vitamine B_1

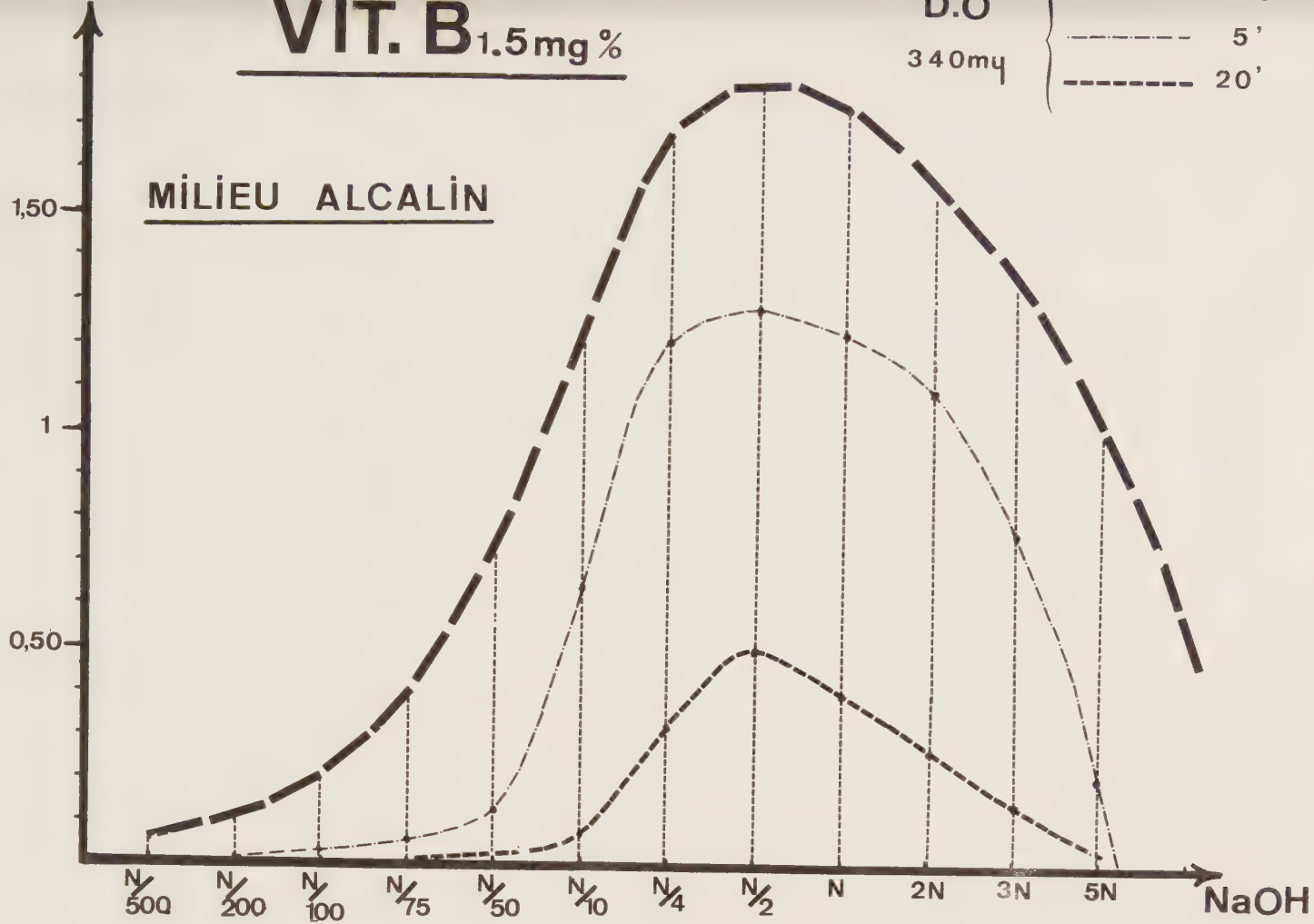


Figure n° 31 - Instabilité de la thiamine en milieu alcalin

LHOEST (52) étudie également les variations du spectre en fonction du temps .

- pour pH compris entre 0 et 7, il n'y a pratiquement aucune modification avec le temps .

- pour pH compris entre 7 et 10, il n'y a pas de grosses variations sur le pic obtenu à 235 mμ ; par contre celui situé à 267mμ diminue assez rapidement .

- pour des pH supérieurs à 10, d'après cet auteur les courbes d'absorption sont trop étroitement liées au facteur temps pour qu'elles aient une valeur absolument rigoureuse . En effet : les spectres présentent dans le temps " de grandes variations" .

Nous avons voulu préciser ce point et nous nous sommes plus particulièrement intéressé au maximum situé à 340 mμ .

Dans une première expérimentation, nous avions remarqué que les variations d'absorption à 340 étaient étroitement liées dans le temps, à la concentration en soude . Nous avons réalisé une étude cinétique de l'intensité obtenue à 340mμ, avec des soudes de normalités différentes : NaOH N/500, N/200, N/100, N/75, N/50, N/10, N/4, N/2, N, 2N, 3N, 5N . Le protocole opératoire est le suivant :

- A Iml d'une solution aqueuse de vitamine B_1 à 50mg %, on ajoute au temps zéro, 9ml de soude de normalité choisie . La cinétique est suivie pendant vingt minutes à 340 mμ . Les résultats obtenus sont rassemblés dans la figure n°31, qui représente les densités optiques obtenues à 340 mμ , en fonction de la concentration en soude à trois temps choisis arbitrairement : 1'30", 5', 20'.

Les trois courbes montrent un minimum d'instabilité (maximum de densité optique), avec NaOH N/2 . De part et d'autre de cette concentration, l'intensité obtenue diminue régulièrement et d'autant plus rapidement que l'on s'éloigne de NaOH N/2 pour devenir pratiquement nulle avec des soudes N/200 et 5 N. La densité optique obtenue avec NaOH N/2 chute de plus des 2/3 de sa valeur en vingt minutes .

2°- Vitamine B_6

a) Chlorhydrate de pyridoxine

La figure n°32 montre que :

. A pH = 1 et 2 on note un maximum d'absorption situé à 292 mμ .

. A pH = 4 et 5 :

- pH = 4 :
L'intensité du maximum d'absorption à 292 mμ diminue fortement, et l'ébauche d'un pic aux alentours de 325 mμ apparaît .

- pH = 5 : le pic situé à 292 mμ diminue encore et l'on voit apparaître très nettement un maximum d'absorption pour λ = 324 mμ .

. Pour des pH compris entre 6 et 8 le maximum d'absorption situé à 292mμ a totalement disparu pour faire place à un pic important à 324 mμ . HARRIS,WEBBS et FOLKERS (34) attribuent cet effet bathochrome à la structure phénolique de la molécule dont on sait que l'ion phénate possède une énergie de résonance supérieure à celle du phénol . D'autre part, un pic de faible intensité apparaît à 253 .

. . A pH = 9, 10, 11, 12, 13 , on observe un effet hypsochrome avec : deux maximum situés respectivement à 248 mμ et 315 mμ .

b) Pyridoxamine :

Les différents spectres obtenus sont tout à fait comparables à ceux de la pyridoxine, qualitativement et quantitativement . A pH = 7, on observe en particulier le maximum d'absorption à 324 mμ .

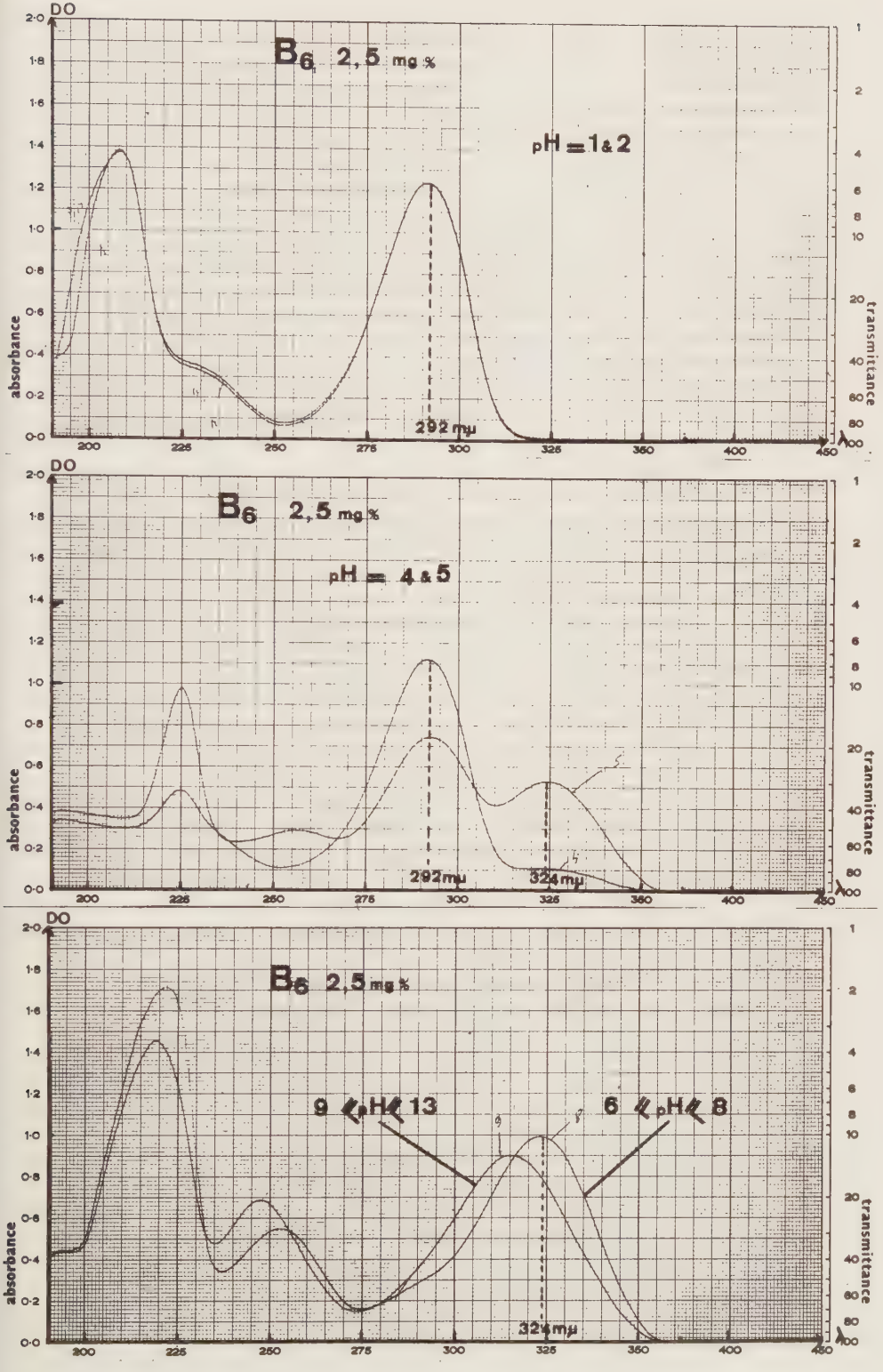


Figure n° 32 - Influence du pH sur le spectre U.V. de la vitamine B_6

c) Pyridoxal chlorhydrate

Les spectres obtenus sont assez différents de ceux de la pyridoxine . En effet :

- pour les pH = 1 et 2, on observe un maximum d'absorption à 290 mμ .

- pour les pH = 3 et 4 , deux maxima apparaissent à 240 et 302 mμ .

- pour les pH = 5 et 6, le maximum à 302 mμ a totalement disparu ; une absorption intense se manifeste à 320 mμ , ainsi qu'un pic plus faible à 255 mμ .

- pour les pH = 7 et 8, on observe un effet hypsochrome amenant les deux maximum à 250 et 315 mμ .

- pour pH = 9, 10, 11, 12 , le phénomène s'accentue et l'on observe deux maxima à 240 et 300 mμ .

- pour un pH supérieur à 12, un pic de faible intensité est observé à 390 mμ .

d) Pyridoxal phosphate

Les spectres de ce composé se différencient nettement des précédents : en effet , on observe :

- en milieu acide (pH = 1) : deux maximum d'absorption à 295 mμ et 335 mμ .

- en milieu neutre (pH = 7) : un maximum d'absorption à 390 mμ précédé d'un épaulement à 335 mμ .

- en milieu alcalin (pH = 13) : un seul maximum très important à 390 mμ .

Cette différence de comportement entre le chlorhydrate de pyridoxal et le pyridoxal phosphate est expliquée par HEYL et coll. (36) de la manière suivante : le pyridoxal a la possibilité de se cycliser en formant un hémiacétal , cyclisation que l'estérification du groupement alcoolique dans le pyridoxal phosphate empêche . Ce fait a été vérifié en spectrophotométrie infra-rouge par ANDERSON et MARTELL (1) .

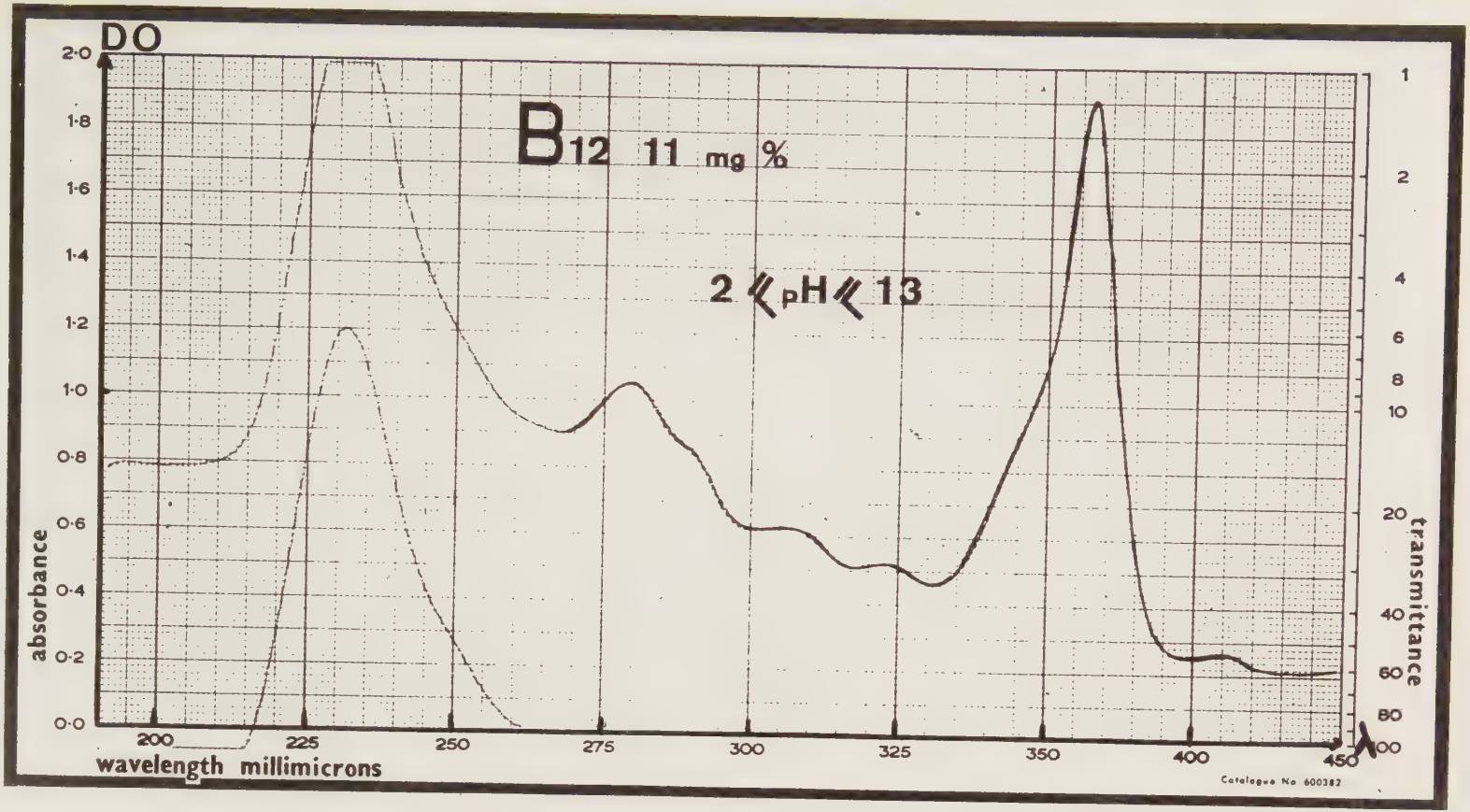


Figure n° 33 - Influence du pH sur le spectre U.V. de la cyanocobalamine.

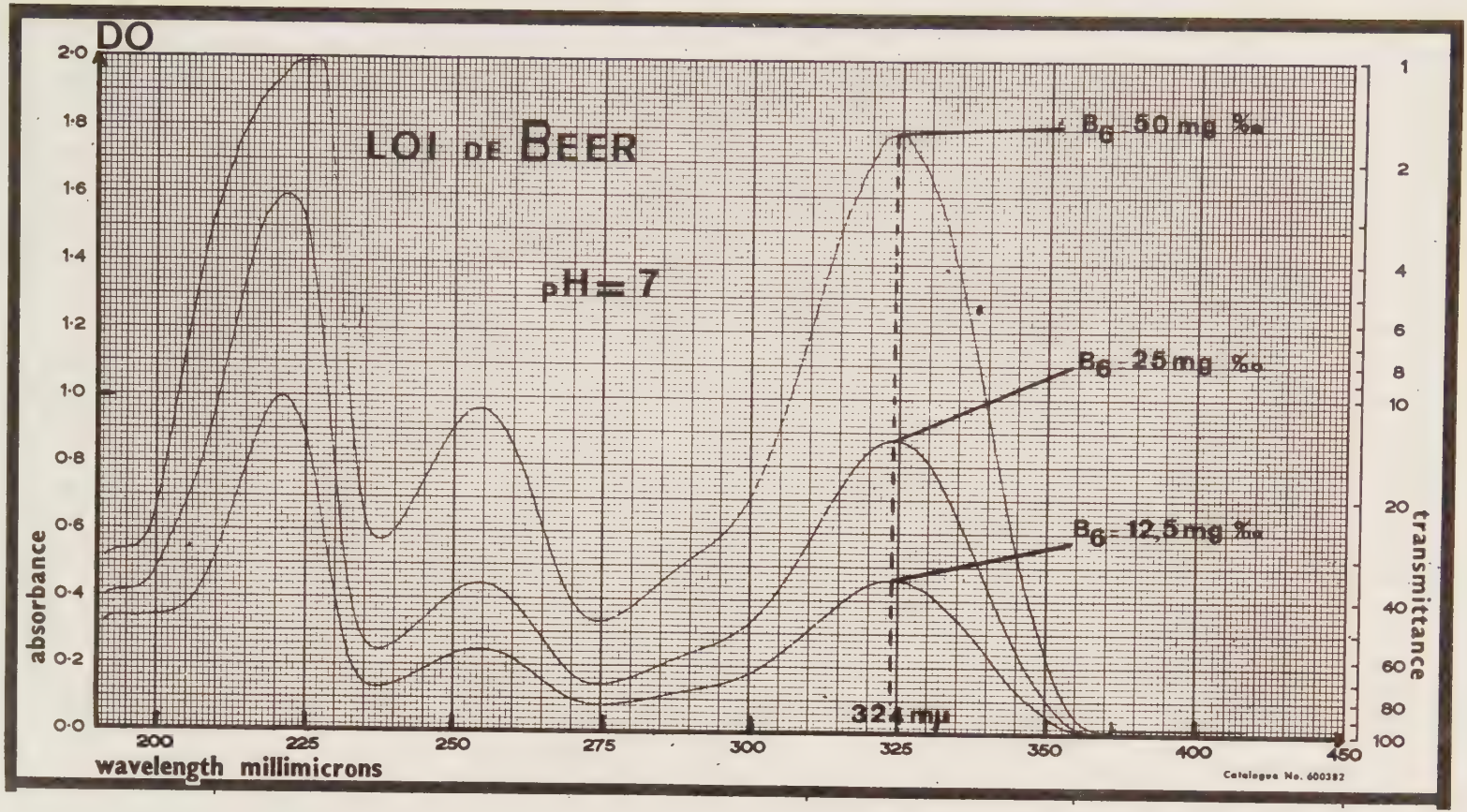


Figure n° 34 - A = f(C) - Loi de BEER

GAUDIANO et coll. (28) montrent que la stabilité de ces différents spectres d'absorption est bonne (2 jours) à tous les pH notamment en milieu alcalin .

3°- Vitamine B_{12} (figure n°33)

- sous la forme de cyanocobalamine , le spectre d'absorption est d'une grande complexité . On peut y voir un pic important à 232 mμ , puis une série de pics moins prononcés à 280 mμ , 307 mμ et 323 mμ ; enfin on note un maximum très important à 361 mμ . Ce spectre d'absorption contrairement à celui des autres vitamines étudiées, ne subit aucun changement, tant qualitatif que quantitatif , lorsqu'on le soumet aux variations de pH , comme le montre la figure n°33 .

- Sous la forme d'acétate d'hydroxocobalamine , le spectre d'absorption présente une allure voisine, si ce n'est un déplacement général vers des longueurs d'onde plus faibles . On observe un maximum à 351 mμ au lieu de 361 mμ pour la cyanocobalamine . Cette légère différence qualitative spectrale entre les deux cobalamines avait , d'ailleurs déjà été signalée par GLASS (31) . La sensibilité aux deux maxima (361 mμ pour la cyanocobalamine et 351 mμ pour l'hydroxocobalamine), est analogue pour des concentrations identiques de ces deux composés .

C / LOI DE BEER-LAMBERT

Pour chaque vitamine, nous avons précisé le domaine d'applications de la loi de Beer-Lambert aux différents maximum d'absorption . La figure n°34 montre les résultats obtenus pour le chlorhydrate de pyridoxine: entre 12,5 et 50mg%, cette loi est parfaitement vérifiée . La thiamine, la cyanocobalamine et l'hydroxocobalamine nous ont fourni des résultats tout à fait similaires .

CHAPITRE III

INTERET ANALYTIQUE DE LA SPECTROPHOTOMETRIE U.V.

°°°

L'association fréquente des trois vitamines B_1 , B_6 , B_{12} dans les médicaments nous a incité à mettre sur pied un protocole de dosage de chacune d'entre elles par spectrophotométrie ultra-violette, sans séparation préalable . Pour résoudre ce problème, nous avons tenu compte de deux ordres de faits :

1°- des proportions relatives des différentes vitamines dans leurs associations; ces proportions sont dû même ordre pour la thiamine et la pyridoxine, alors que la vitamine B_{12} est utilisée à des doses environ 200 fois plus faibles que les composés précédents .

2°- de l'influence du pH sur les spectres d'absorption de ces vitamines, influence que nous avons précisée dans le chapitre précédent .

Nous distinguerons :

A - le dosage de la thiamine .

B - le dosage de la pyridoxine .

C - le dosage de la vitamine B_{12} (cyanocobalamine et hydroxocobalamine) .

A / DOSAGE DE LA THIAMINE

Ce dosage dans le mélange des trois vitamines implique que l'interférence de la pyridoxine et de la vitamine B_{12} n'existe pas .

1°- Interférence de la pyridoxine

Elle est éliminée en opérant la lecture dans la soude N/2 . En effet, dans un tel milieu, la pyridoxine ne présente aucune absorption à 340 mμ (figure n°32), alors que la thiamine présente une absorption notable à cette longueur d'onde :

$$(E^{1\%}_{1cm} = 260 \text{ après 5 minutes }),$$

dont l'instabilité est réduite (figure n°31) .

2°- Interférence de la vitamine B_{12}

Compte-tenu des proportions relatives de cette vitamine dans les associations B_1, B_6 , B_{12} (concentration 200 fois plus faible environ que celle de la thiamine), que ce soit sous la forme cyanocobalamine, que ce soit sous la forme hydroxocobalamine), l'interférence apportée dans une lecture à 340 mμ est absolument négligeable (inférieure à 0,20 %) .

3°- Remarque

Il est possible d'augmenter encore le degré de spécificité en jouant sur l'instabilité de la thiamine en milieu alcalin . En effet, en effectuant deux mesures,l'une au bout de cinq minutes et dans la soude N/2 , donnera l'absorption globale thiamine + interférences éventuelles , l'autre, dans la soude N/200 donnera les seules interférences puisque, dans ces conditions, l'absorption à 340 mμ de la thiamine a complètement disparu . La différence entre les deux mesures donnera l'absorption réellement due à la thiamine .

B / DOSAGE DE LA PYRIDOXINE

1°- Interférence de la thiamine

Elle est éliminée en effectuant la lecture spectrophotométrique dans un tampon de pH = 7 puisque dans ces conditions, la thiamine ne présente aucune absorption à 324 mμ (figure n°30) alors que la pyridoxine, à cette longueur d'onde, montre précisément une absorption maximale :

$$(E^{1\%}_{1cm} = 400) .$$

2°- Interférence de la vitamine B_{12}

Comme dans le cas de la thiamine, cette interférence est absolument négligeable (inférieure à 0,20%)

3°- Remarque

Il est également possible ici d'augmenter la spécificité de la méthode en utilisant l'action de l'acide borique . En effet, dans un tel milieu et à un pH de 7, le maximum d'absorption est ramené de 324 mμ à 292 mμ , comme si nous nous trouvions en milieu acide . Donc , en effectuant deux mesures spectrophotométriques :

- l'une en tampon borique ramené au même pH de 7, donnera l'absorption des seules interférences .

- l'autre, en tampon phosphate de pH = 7 , donnera l'ensemble pyridoxine + interférences . Par différence entre les deux mesures on obtiendra l'absorption réellement due à la pyridoxine .

C / DOSAGE DE LA VITAMINE B_{12}

Les interférences de la thiamine et de la pyridoxine sont éliminées en effectuant les mesures d'absorption dans l'acide sulfurique N/10 . Dans ces conditions en effet, seules la cyanocobalamine ou l'hydroxocobalamine présentent une absorption respectivement située à 361 mμ ($E^{1\%}_{1cm} = 172$) et à 351 mμ ($E^{1\%}_{1cm} = 170$)

CHAPITRE IV

APPLICATIONS DE LA SPECTROPHOTOMETRIE U. V. AU DOSAGE DES VITAMINES B_1, B_6 et B_{12} DANS LES MEDICAMENTS : METHODES MANUELLES

°°°

I - RAPPEL DES TRAVAUX ANTERIEURS

Si l'étude des spectres d'absorption de la pyridoxine, de la thiamine et de la cyanocobalamine a fait l'objet de nombreux travaux, moins nombreuses sont les publications traitant de l'application de la spectrophotométrie U. V. comme méthode de dosage directe , sans séparation préalable de ces trois vitamines . Nous avons cependant relevé les résultats suivants :

Pour la vitamine B_{12}, OSTET-CONTER (60) rapportent une méthode de dosage dans les associations avec la thiamine .Ces auteurs indiquent que le dosage spectrophotométrique à 361 mμ de la cyanocobalamine est perturbé par la vitamine B_1 si cette dernière se trouve à une concentration supérieure à 20 mg/ml ainsi que par ses produits de dégradation . Il propose alors deux méthodes pour remédier à cet inconvénient :

a) Soit réaliser le dosage spectrophotométrique dans le visible à 548 mμ , longueur d'onde à laquelle il n'a observé aucune interférence de la thiamine ou de ses produits de dégradation .

b) Soit réaliser le dosage spectrophotométrique dans l'U. V. à 361 mμ mais après avoir éliminé de la solution les produits de dégradation de la thiamine par chromatographie sur colonne mixte d'Amberlite IR 120 Na + et IRA 400 OH^- . Ces résines ne fixent pratiquement pas la cyanocobalamine qui se retrouve donc en solution pure .

Pour la vitamine B_1 , le même auteur préconise un dosage à 236 mμ dont les résultats sont comparables à ceux obtenus par les autres méthodes habituelles (microbiologie, gravimétrie, fluorométrie) . Cette méthode ne paraît pas applicable aux spécialités contenant de la pyridoxine en raison des interférences qu'elle présente dans cette zone du spectre .

D'autre part, DOHERTY (21) préconise le dosage de la thiamine dans des formes simples par mesure de son absorption à 246 mμ en milieu acide (pH =2) .

D'autres méthodes de dosage spectrophotométrique sont décrites par divers auteurs dans les préparations polyvitaminées . C'est ainsi que BURGER (14) l'applique aux dosages des vitamines A, B_2, B_6 et E dans une préparation contenant d'autres vitamines notamment , la thiamine , la vitamine K et la nicotinamide ; l'auteur indique que la détermination de la pyridoxine est rendue très difficile par spectrophotométrie U. V., en raison des importants changements que subit son spectre d'absorption en fonction du pH . Ce dosage est cependant possible spectrophotométriquement en utilisant la "méthode additive d'évaluation" . Dans ce cas, le pH de l'extrait aqueux renfermant la vitamine B_6 est fixé à 5 au moyen d'un tampon acéto-acétique . Après la mesure de l'absorption à 325 mμ , une solution standard de teneur en vitamine B_6 connue est ajoutée à l'extrait, et l'absorption est alors à nouveau mesurée . De ces deux mesures, en tenant compte le mieux possible de la dilution réalisée, on peut calculer la teneur réelle en vitamine B_6 . Cet auteur, par contre, n'indique pas de mesure spectrophotométrique U. V. pour la thiamine .

Les méthodes les plus couramment décrites de spectrophotométrie U. V. font appel à une séparation physique préalable . RANSY (67) réalise ainsi après résolution chromatographique le dosage de la thiamine et de la vitamine B_{12} sous forme de cyanocobalamine . FORSTER (26) signale un dosage à 292mμ en milieu acide de la pyridoxine après chromatographie par échange d'ions sur acide alginique .

SHAH et coll. (74) ont indiqué une méthode basée sur la différence d'absorption de la pyridoxine à deux longueurs d'onde dans un même solvant pour le dosage de cette vitamine dans les spécialités polyvitaminées et plus particulièrement dans les préparations contenant le complexe des vitamines du groupe B . Plus récemment , les mêmes auteurs (75) ont modifié ce dosage spectrophotométrique du chlorhydrate de pyridoxine en décrivant une technique basée sur la différence de l'absorption obtenue dans deux solvants à 326 mμ : un tampon phosphate glycériné d'une part et l'acide chlorhydrique 0,1N . D'autre part; ils signalent la différence spectrale qui existe dans ces deux cas (λ max = 326 mμ pour la solution de pH = 7 et aucune absorption à cette longueur d'onde en milieu acide). L'interférence due à la vitamine B_2 par exemple qui absorbe à 328 mμ , peut être facilement contrôlée car pour cette vitamine les spectres en solution aqueuse et en solution acide sont absolument identiques . Cette technique a été appliquée au dosage de la pyridoxine dans des tablettes broyées et dissoutes directement, une partie dans le tampon de pH = 7 et une autre partie de poids identique dans de l'acide chlorhydrique 0,1 N. Elle est également indiquée dans le cas de solutés injectables par dilution directe de ceux-ci dans les deux solvants . D'autres adaptations de cette technique ont été proposées par TARDIFF (82) et per ELDWIGE et coll. (24) .

II - CONTRIBUTION PERSONNELLE

Nous exposerons d'abord les travaux intéressant le dosage de la vitamine B_6 qui sont les plus importants puis nous verrons le dosage de la thiamine et des vitamines B_{12} .

DOSAGE DE LA VITAMINE B_6

La composition des spécialités auxquelles nous avons appliqué ce dosage est résumée dans la figure n°35, différentes formes ont été utilisées : comprimés, dragées, suppositoires, sirop , ampoules . D'autre part, formes simples et associations polyvitaminées ont été testées . Parmi celles-ci nous avons essayé une spécialité contenant 4 vitamines B_1, B_6 , B_{12} et C : les gélules de Bétriphos C .

A / MATERIEL, REACTIF, PROTOCOLE EXPERIMENTAL

1°- Matériel

- Spectrophotomètre Unicam SP 800 ou SP 500 .

2°- Réactifs

- Tampon pH = 7
  - . phosphate de potassium anhydre 2,72g% 25ml
  - . NaOH N/5 ..... 14,80ml
  - . Eau bi-distillée Q. S. P. ..... 100 ml
  - . chlorhydrate de pyridoxine Touzart et Matignon

	FORMES	Médicaments	Concentrations
B_6	Comprimés	Labaz	250 mg/comp.
		Adrian	250
	Sirop	Labaz	10
	Ampoules	Labaz	50 mg/ml.
		Delagrange	50
		Bécilan	25
	Suppositoires	Labaz	250 mg/supp.
POLYVITAMINES	Ampoules	Tridocélan ✱	30 mg/ml + B_1 + B_{12}
		Terneurine	50 + B_1 + B_{12}
	Comprimés	Roche	250 + B_1
		Roche	250 + B_1 + B_{12}
		Princi B	125 + B_1 + B_{12}
		Bétrimax	100 mg/comp. + B_1 + B_{12}
		Bémulton	250 + B_1 + B_{12}
		Bétriphos C	100 + B_1 + B_{12} + C
		Béneural ✱✱	100

Figure n° 35 - Composition des différentes spécialités à base de vitamine B_6 étudiées.

3°- Protocole expérimental

a) Traitement des spécialités

- formes liquides :

les différentes formes ; solutés buvables, injectables, sirops , gouttes, sont dilués dans de l'eau bi-distillée de manière à obtenir une concentration théorique de 10mg % ; les solutions ainsi obtenues sont elles-même diluées au 1/5 dans le tampon pH = 7.

- formes solides :

ces différentes formes comprimés, poudres, dragées, gélules , etc..... sont reprises par de l'eau bi-distillée après un éventuel broyage . La solution ainsi obtenue est filtrée et diluée de manière à présenter une concentration de 10mg% en chlorhydrate de pyridoxine . On est alors ramené au cas précédent .

Dans le cas des suppositoires, on peut réaliser une extraction en milieu acide sulfurique N/10 à chaud puis une filtration après refroidissement au réfrigérateur . Il suffit ensuite de diluer la solution obtenue jusqu'à une concentration identique à celle des autres formes .

Quelle que soit la forme médicamenteuse dans laquelle on se propose de doser la vitamine B_6 on obtient en fin de compte une solution D en milieu tamponné à pH=7 .

b) Courbe d'étalonnage

Parallèlement, on prépare une courbe d'étalonnage à partir d'une solution mère de chlorhydrate de pyridoxine à 100 mg% que l'on dilue dans les conditions suivantes :

Sol. mère 100mg% 2,5	5	7,5	10	12,5
Eau bi-distillée Q. S. P.. 100	100	100	100	100
Concentration en mg% 2,5	5	7,5	10	12,5

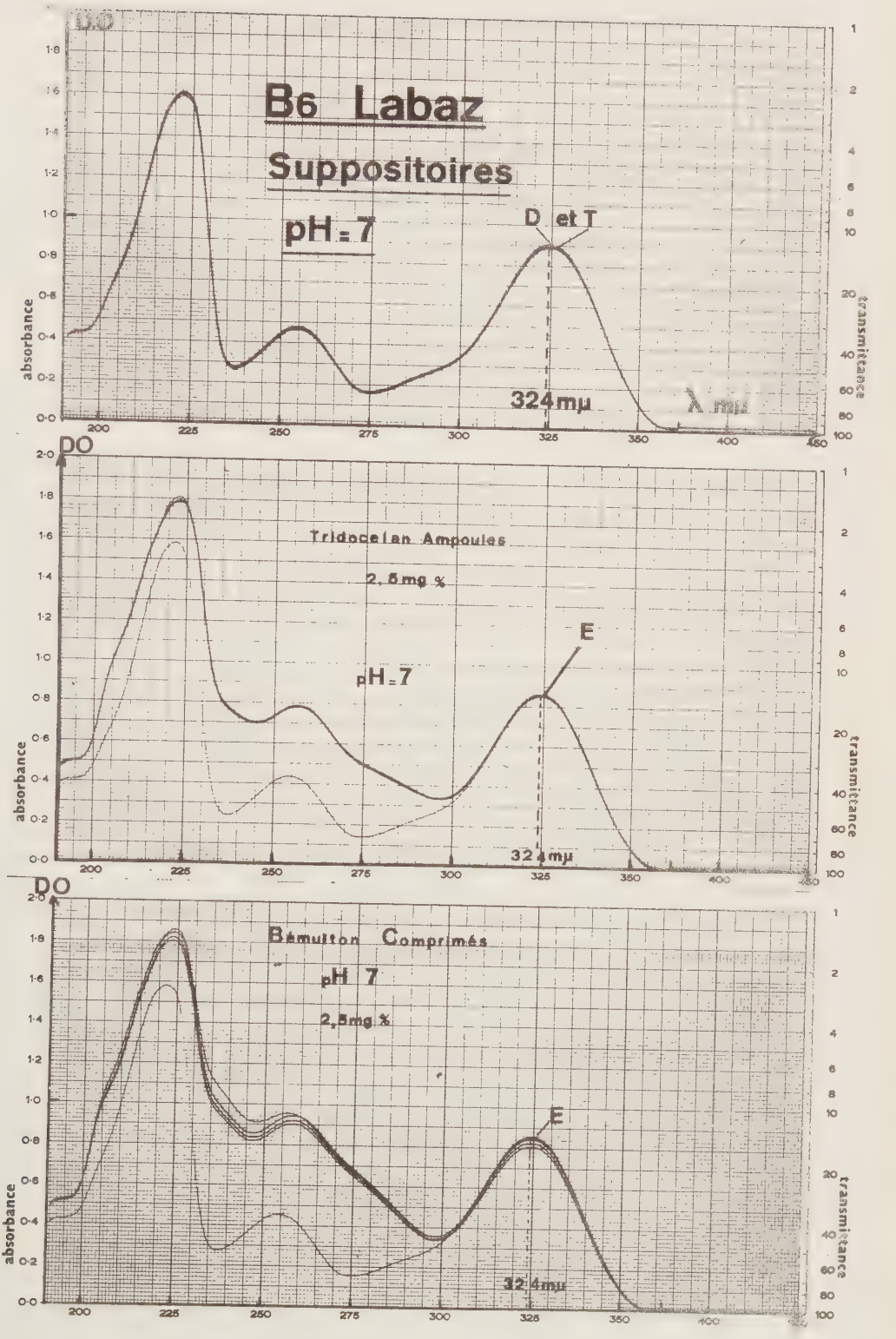


Figure n° 36 - Dosages manuels de vitamine B_6 .

c) Lecture spectrophotométrique et calculs

Les solutions étalons et les solutions obtenues par traitement des spécialités sont alors diluées au 1/5 dans le tampon de pH = 7 pour effectuer la lecture spectrophotométrique à 324 mμ en cuve de 1cm, contre un blanc constitué par une partie d'eau bi-distillée pour 4 parties du même tampon .

On dresse la courbe d'étalonnage avec les densités optiques ainsi obtenues pour les étalons . On reporte la densité optique obtenue pour les spécialités sur la courbe d'étalonnage et en tenant compte du taux de dilution on calcule la teneur en vitamine B_6 du médicament considéré .

B / RESULTATS

La figure n° 36 montre 5 enregistrements de spectres obtenus respectivement avec des suppositoires contenant la vitamine B_6 seule, des comprimés trivitaminés B_1, B_6, B_{12} et une préparation injectable " le Tridocélan" contenant en plus de ces trois vitamines du chlorhydrate de lignocaïne (D) . Chaque dosage est accompagné d'un étalon de chlorhydrate de pyridoxine (E) . On peut voir que les spectres obtenus avec les suppositoires sont tout à fait superposables à celui de l'étalon : on réalise ainsi simultanément identification et dosage . Pour les comprimés et la préparation injectable, il n'y a aucune interférence de la thiamine et de la cyanocobalamine , tout au moins au maximum situé à 324 mμ . L'interférence débute au-dessous de cette longueur d'onde; contrairement aux suppositoires, le spectre n'est donc pas entièrement superposable à celui de l'étalon, mais le dosage n'en est pas moins satisfaisant . Les résultats obtenus avec les autres spécialités y compris le Bétriphos C citées dans la figure n°35, sont tout à fait similaires à ceux que nous venons de signaler .

DOSAGE DE LA VITAMINE B_1

Le protocole de dosage de la thiamine est absolument superposable à celui de la vitamine B_6 . Mais, dans ce cas, le tampon de pH = 7 doit, comme nous l'avons vu dans le chapitre consacré à l'étude expérimentale des spectres, être remplacé par de la soude N/2 . D'autre part, il n'est pas possible de présenter les spectres d'absorption en raison de leur instabilité en milieu alcalin : les lectures se font à longueur d'onde fixe (340 mμ) et au bout d'un temps rigoureusement constant (5') . Dans ces conditions, le dosage assez délicat est cependant réalisable en voie manuelle . La voie automatique comme nous le verrons ultérieurement présente dans ce cas des avantages indiscutables .

DOSAGE DE LA VITAMINE B_{12}

A / MATERIEL, REACTIFS, PROTOCOLE EXPERIMENTAL

1°- Matériel

Le matériel nécessaire est identique à celui utilisé pour le dosage de la pyridoxine et de la thiamine .

2°- Réactifs

- Acide sulfurique 0,1 N
- Cyanocobalamine
- Acétate d'hydroxocobalamine

3°- Protocole expérimental

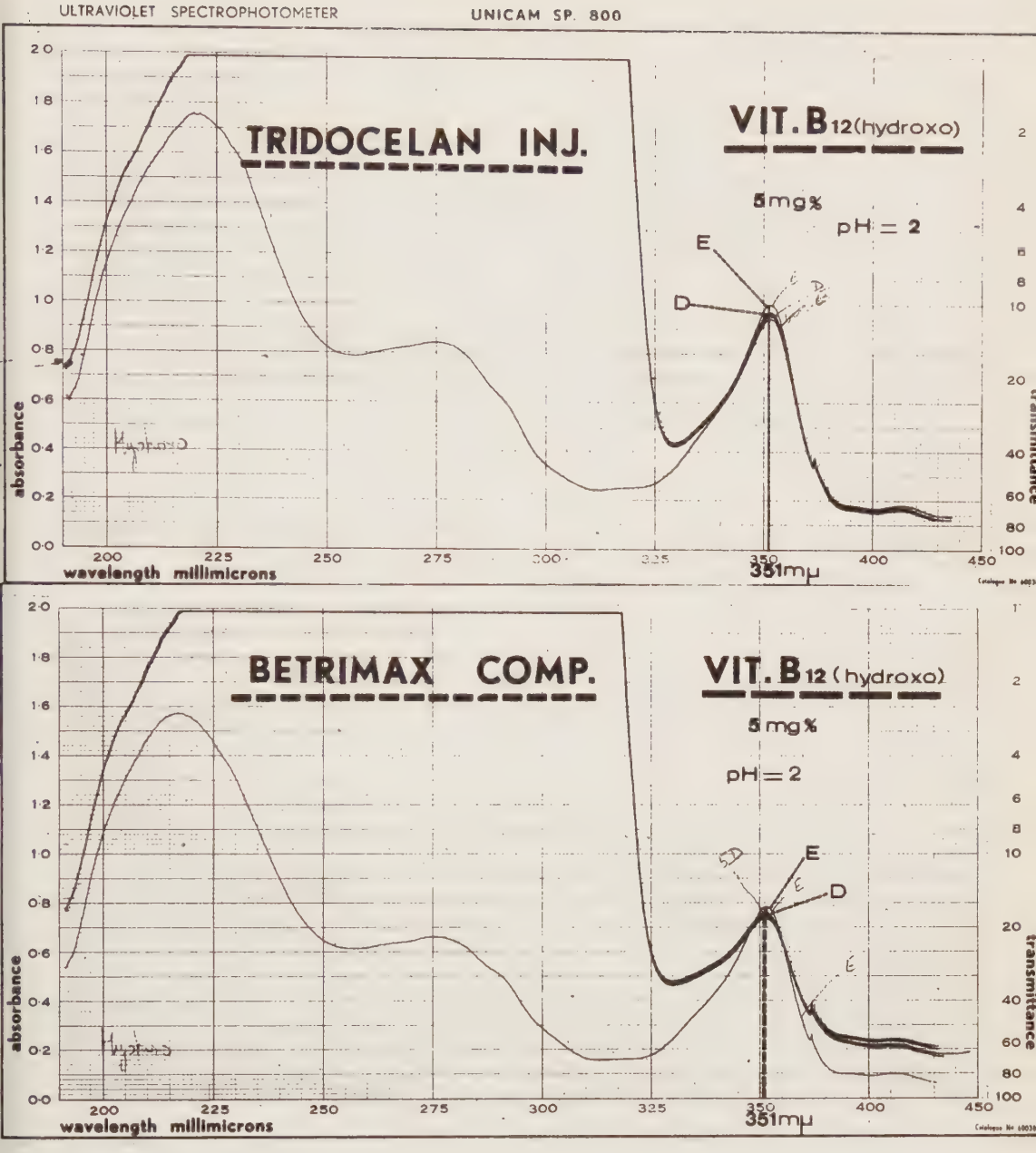


Figure n° 37 - Dosages manuels de vitamine B_{12}

a) Traitement des spécialités

Les différentes formes liquides sont diluées directement par l'acide sulfurique N/10 , de manière à obtenir une solution de concentration finale égale à 5mg%: solution D .

b) Etalonnage

On prépare une solution mère de cyanocobalamine ou d'acétate d'hydroxocobalamine à 100mg % dans l'acide sulfurique 0,1 N que l'on dilue de la façon suivante:

Solution mère à 100mg%	2,5 ml	5 ml	10 ml
H_2SO_4 0,1 N Q.S.P.	100 ml	100 ml	100 ml
Concentration mg%	2,5	5	10

B / RESULTATS

La figure n°37 montre 5 enregistrements de spectres obtenus dans ces conditions avec des comprimés trivitaminés B_1, B_6, B_{12} et une forme injectable également trivitaminée (D) . Pour chacun de ces composés et dans les mêmes conditions, nous avons enregistré le spectre obtenu avec une solution pure de vitamine B_{12} dans l'acide sulfurique N/10 (E). Ces enregistrements montrent que, sur le maximum d'absorption situé à 351 il n'y a aucune interférence de la pyridoxine et de la thiamine . Par contre, pour des longueurs d'onde plus faibles, compte tenu des concentrations élevées de ces vitamines, le spectre des spécialités se différencie nettement de celui de l'étalon .

CHAPITRE V

APPLICATIONS DE LA SPECTROPHOTOMETRIE U. V. AU DOSAGE DES VITAMINES B_1, B_6, B_{12} DANS LES MEDICAMENTS : METHODES AUTOMATIQUES

°°°

Après avoir adopté la spectrophotométrie U. V. au dosage manuel des vitamines B_1, B_6 et B_{12}, nous avons voulu transposer cette méthode, compte tenu de son extrême simplicité, en voie automatique, tant pour les formes liquides que pour les formes solides.

I - METHODES AUTOMATIQUES adaptées au contrôle des formes liquides ou des formes solides mises en solution.

L'étude réalisée précédemment montre que, le dosage de la thiamine et de la pyridoxine peut être réalisé dans des conditions de concentrations tout à fait analogues. La seule différence réside dans le remplacement du tampon de pH = 7, pour le dosage de la pyridoxine, par de la soude N/2 pour le dosage de la vitamine B_1. Un seul et même montage peut donc être utilisé pour la détermination de ces deux paramètres. Il sera étudié tout d'abord ; le dosage de la vitamine B_{12} sera envisagé séparément.

A / DOSAGE DE LA VITAMINE B_1 ET DE LA VITAMINE B_6

1°- Matériel, réactifs, échantillonnages .

a) Matériel :

- une chaîne autoanalyser Technicon comprenant :
  - . un distributeur d'échantillons "Sampler II"
  - . une pompe proportionnante
  - . un enregistreur
- un spectrophotomètre U. V. Beckmann DB équipé pour l'analyse en continu .

b) Réactifs :

Les réactifs (tampon de pH= 7 et NaOH N/2) sont les mêmes que ceux décrits précédemment pour la méthode manuelle .

c) Echantillonnages :

1- Etalonnage

L'autoanalyser permettant des lectures de densités optiques relativement faibles, la méthode, est plus sensible qu'en voie manuelle . On peut en effet lire spectrophotométriquement des concentrations finales de l'ordre de 0,50 à 1 mg% . On prépare une solution mère de chlorhydrate de pyridoxine ou de chlorhydrate de thiamine à 1g% que l'on dilue de la manière suivante :

Solution mère à 1g%	5ml	10ml	15ml	20ml
Eau bi-distillée Q. S. P.	100ml	100ml	100ml	100ml
Concentration eng‰	0,50	1	1,50	2

2- Pour les différentes formes médicamenteuses deux cas se présentent :

- Les formes solides sont traitées de manière à obtenir une solution de concentration entrant dans la gamme d'étalonnage; ainsi le Tridocélan lyophilisé est repris par 100ml d'eau bi-distillée .

- Les formes liquides ne subissent aucun traitement préalable : la dilution nécessaire est assurée par l'auto analyser .

2°- Manifold

Le schéma du manifold est représenté sur la figure n°38 . Comme on peut le voir, une double dilution est réalisée au moyen d'un C débulleur permettant une reprise d'un aliquot de la première dilution qui est dilué une seconde fois au tampon de pH = 7 pour le dosage de la pyridoxine ou avec la soude N/2 pour le dosage de la thiamine .

3°- Résultats et discussion

- Sur la figure n°39 sont représentés des enregistrements répétés d'une préparation injectable lyophilisée " le Tridocélan,"contenant de la thiamine, de la pyridoxine et de la vitamine B_{12} , sous forme de cyanocobalamine . On peut y voir l'excellente reproductibilité d'un dosage à

B_1 - B_6 U.V. FORMES LIQUIDES

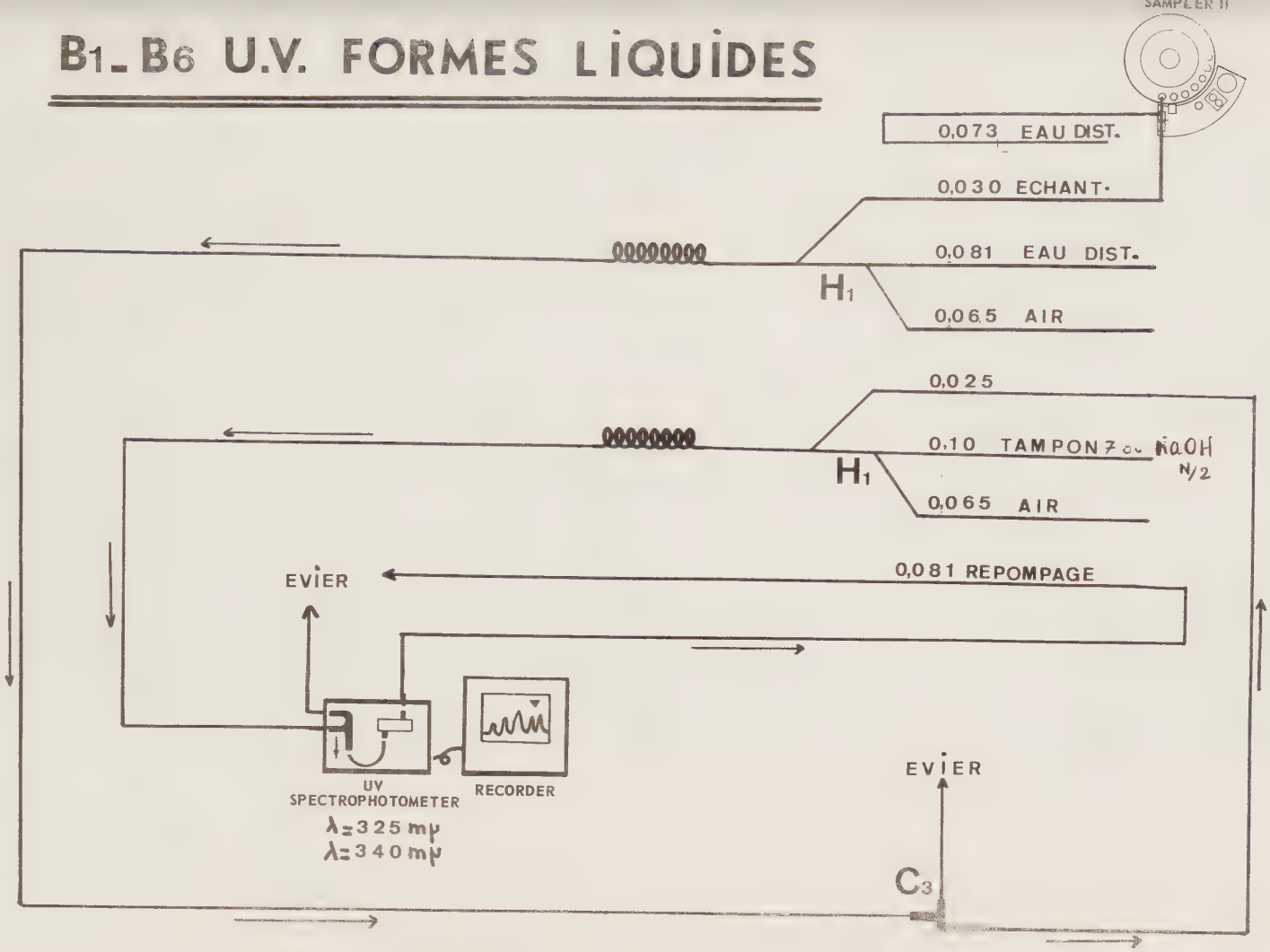


Figure n° 38 - Manifold pour le dosage U.V. de la vitamine B_1 et de la vitamine B_6 (formes liquides).

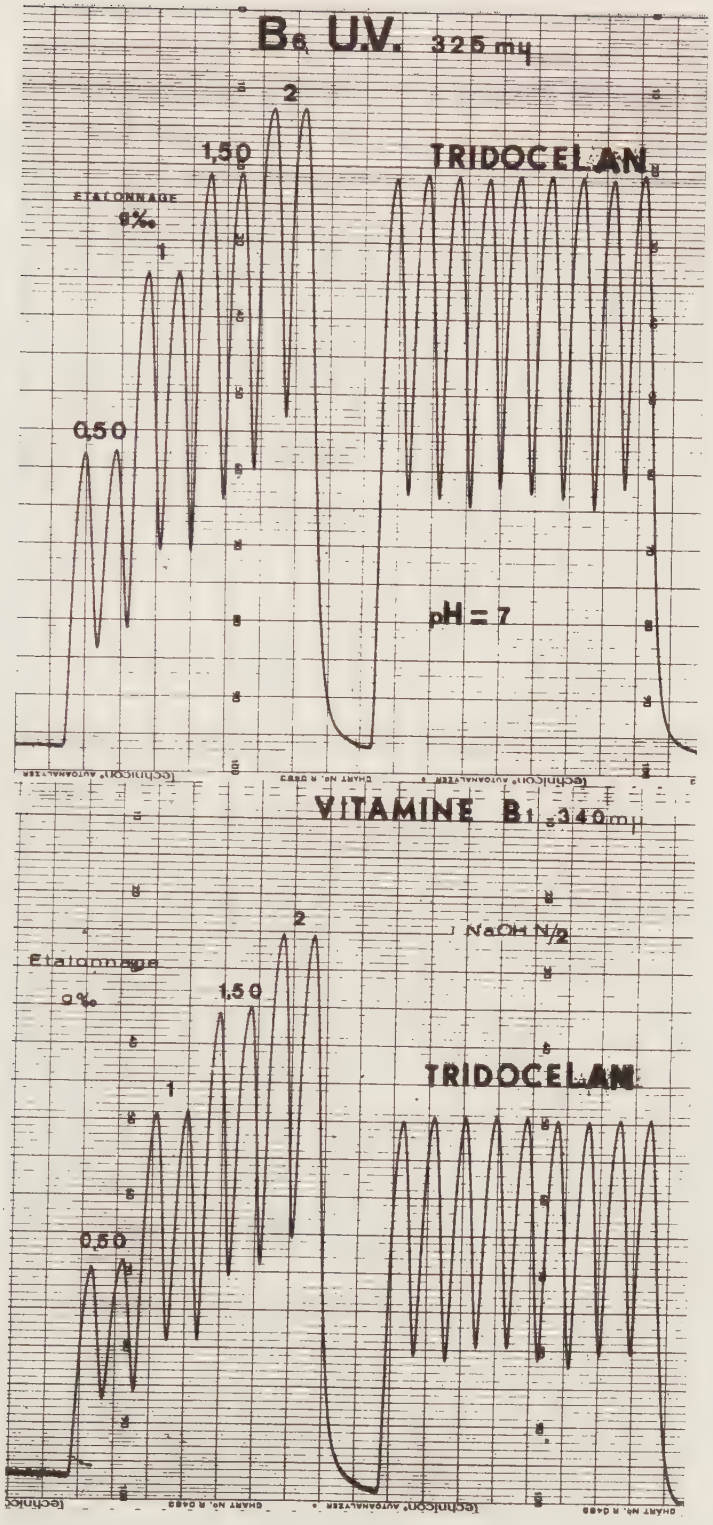


Figure n° 39 - Dosages automatiques de vitamine B_1 et B_6 (formes liquides).

BECILAN INJ.

LOTS	10 ANALYSES										MOY.	σ
1	102	100,5	101	102,5	101	101	101	100,7	101	100	101	0,70
2	103,5	102	102	103	101	103,5	101	101,5	103	101	102,15	1,04
3	100,5	102	100,5	102	103	101	101	100,5	102	100,5	101,35	0,91
4	100,5	100,5	100	100,5	99	101,5	100	99	101	102,5	100,4	0,97
5	100	100,5	100,5	101,5	102	100	100,5	100	100	100	100,5	0,70
6	100,5	100,5	101,5	101,5	101,5	102	102	101	101	102	101,35	0,60
7	99	100	99,5	99,5	100,5	100	100	100	100	100	99,5	0,65
8	100	101	100,5	101	100,5	100,5	100,5	100,5	100,5	100,5	100,5	0,28

DOSAGE AUTOMATIQUE UV B_6

Figure 40 - Résultats des dosages automatiqués UV de 8 lots de Bécilan injectable (B_6)

l'autre, pour une cadence de travail réelle de 40 examens/heure . Nous avons dosé avec ce système huit lots différents d'ampoules de Bécilan injectable . Pour chaque lot, 10 analyses ont été effectuées . Les résultats obtenus sont rassemblés dans la figure n°40 sur laquelle on peut voir les différents pourcentages obtenus par rapport à la valeur théorique, puis la moyenne de ces résultats pour chaque lot . D'un lot à l'autre les différences ne sont jamais significatives .

- L'emploi d'un manifold commun pour ces deux dosages, permet d'effectuer très facilement sur les mêmes échantillons le dosage de cesdeux vitamines sans changer le plateau de distribution . Il suffit pour cela de préparer des étalons mixtes, contenant thiamine et pyridoxine ; on effectue une première série de dosages en milieu tampon de pH = 7 , à 325 mμ , puis on remplace la solution tampon par de la soude N/2 et on effectue une deuxième série de dosages à 340 mμ . On peut également réaliser ces dosages simultanément en doublant le système de détection . Le liquide de reprise, après le C débulleur, sera alors partagé en deux, un aliquot se diluant dans le tampon de pH = 7, un autre dans la soude N/2 . Le premier sera mesuré à 324 mμ , l'autre à 340 mμ .

- L'acide borique, qui inhibe l'absorption de la pyridoxine à 324 mμ à pH = 7 , et permet de révéler la présence possible d'interférences, peut ici fort bien être employé . Un premier tour de plateau effectué dans les conditions normales donne la somme pyridoxine plus interférences éventuelles . Un deuxième tour de plateau est effectué en remplaçant la solution tampon de pH = 7 par une solution d'acide borique ramenée au même pH . On obtient ainsi , les seules interférences .

- Il est également possible d'utiliser l'instabilité de la thiamine en milieu alcalin, dans le même but,comme nous l'avons signalé précédemment . On réalise une première série de dosages avec la soude N/2 , puis une deuxième série avec de la soude N/200, pour laquelle nous avons déjà eu l'occasion de voir que l'absorption

(1) *Nous remercions bien vivement Monsieur BENAZET, Directeur Régional des Laboratoires SPECIA, qui a eu l'amabilité de nous fournir ces différents lots.*

était pratiquement nulle, dans les conditions de temps équivalentes à celles observées dans le montage précédemment décrit (figure n°38) . De toute manière, nous n'avons pas noté d'interférences significatives dans les différents dosages que nous avons réalisés sur les spécialités indiquées sur la figure n°35 .

Très supérieure déjà sur le plan de la sensibilité en raison de sa meilleure précision, la méthode automatique présente en outre de très gros avantages dès que l'on a affaire à des réactions instables , comme c'est le cas du spectre U. V. de la vitamine B_1 en milieu alcalin. En effet, manuellement, la mesure de l'absorption de la thiamine dans un tel milieu quoique réalisable, est délicate en raison de cette instabilité . Des conditions de temps très précises doivent notamment être respectées . En voie automatique, au contraire, de telles difficultés sont aplanies et la fidélité de la méthode est nettement accrue : la vitesse rigoureusement constante avec laquelle la pompe proportionnante prélève les différents échantillons et permet aux fluides de progresser dans le système, assure un délai de temps identique pour tous les dosages entre le moment du mélange de la vitamine avec la soude N/2 et l'entrée de l'analyse dans la cuve de mesure .

D'autre part, toujours en raison de l'instabilité de la thiamine en milieu alcalin l'introduction d'une bobine de délai plus ou moins importante avant la mesure spectrophotométrique, permet d'effectuer avec un même manifold des dosages dans des conditions de concentration fort différentes . Ainsi le montage décrit précédemment permet :

- avec une bobine simple de mélange, d'effectuer des lectures dans des domaines de concentrations compris entre 0, 25 et 2, 5g% . de thiamine .

- avec une bobine de délai de 20' , de sensibiliser environ 5 fois la technique . Cette sensibilisation peut en outre être augmentée en plaçant à l'échantillonnage un tube de débit moindre .

B / DOSAGE DE LA VITAMINE B_{12}

1°- Matériel, Réactifs, Echantillonnages

a) Matériel :

Le matériel nécessaire est le même que celui utilisé pour le dosage de la pyridoxine et de la thiamine .

b) Réactifs

- Acide sulfurique
- Cyanocobalamine
- Acétate d'hydroxocobalamine .

c) Echantillonnages :

- Etalonnage :

Ici encore, on peut travailler avec des taux de vitamine B_{12} inférieurs à ceux nécessaires pour la méthode manuelle .

Préparer une solution mère de cyanocobalamine ou d'acétate d'hydroxocobalamine dans l'eau bidistillée à 100 mg% . A partir de cette solution mère , réaliser les dilutions suivantes :

Solution à 100 mg% 10	15	20	25	30
Eau bi-distillée Q. S. P. 100	100	100	100	100
Concentration mg% 10	15	20	25	30

B12 . FORMES LIQUIDES

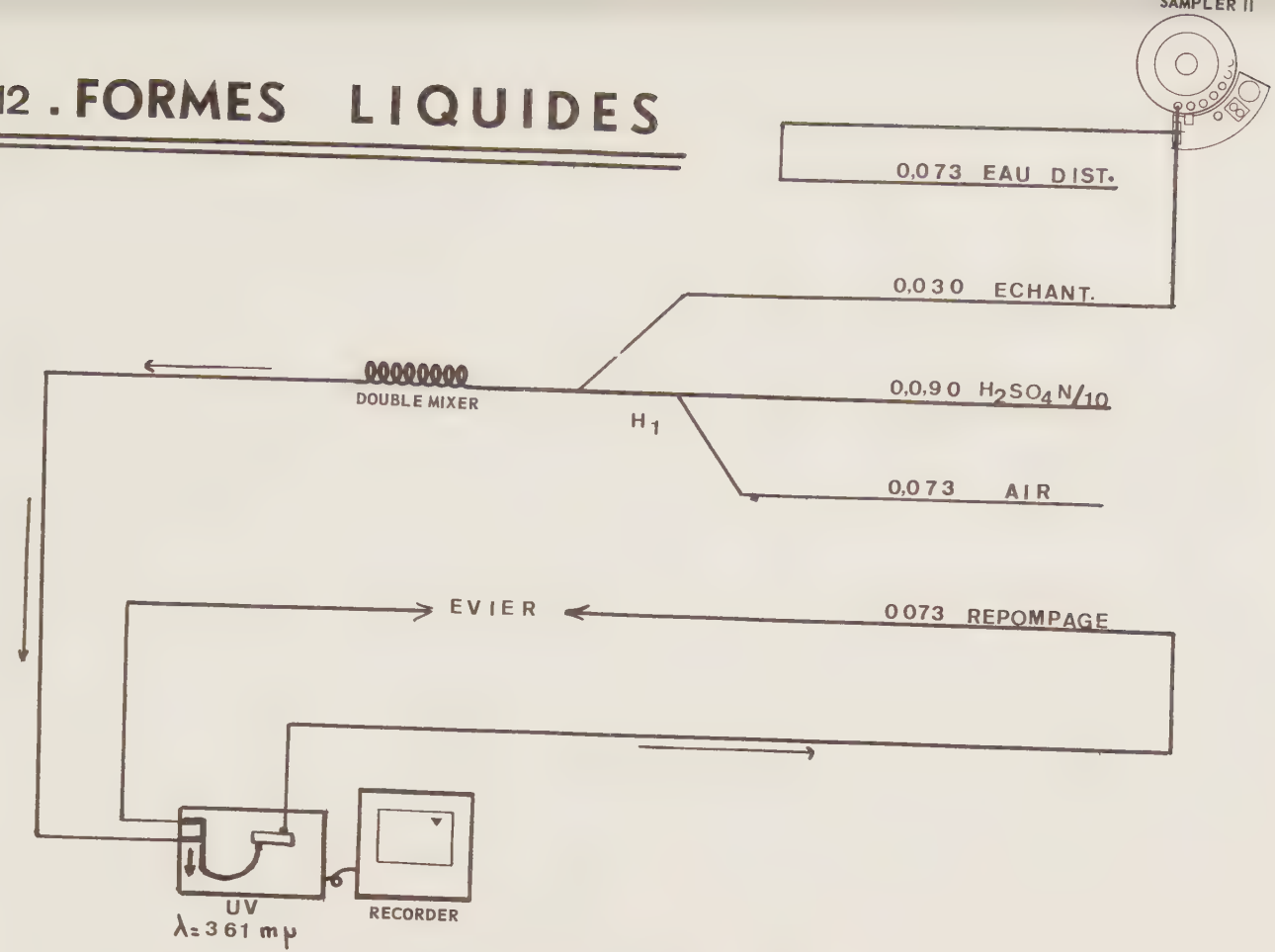


Figure n°. 41 - Manifold pour le dosage UV de la vitamine B_{12} (formes liquides)

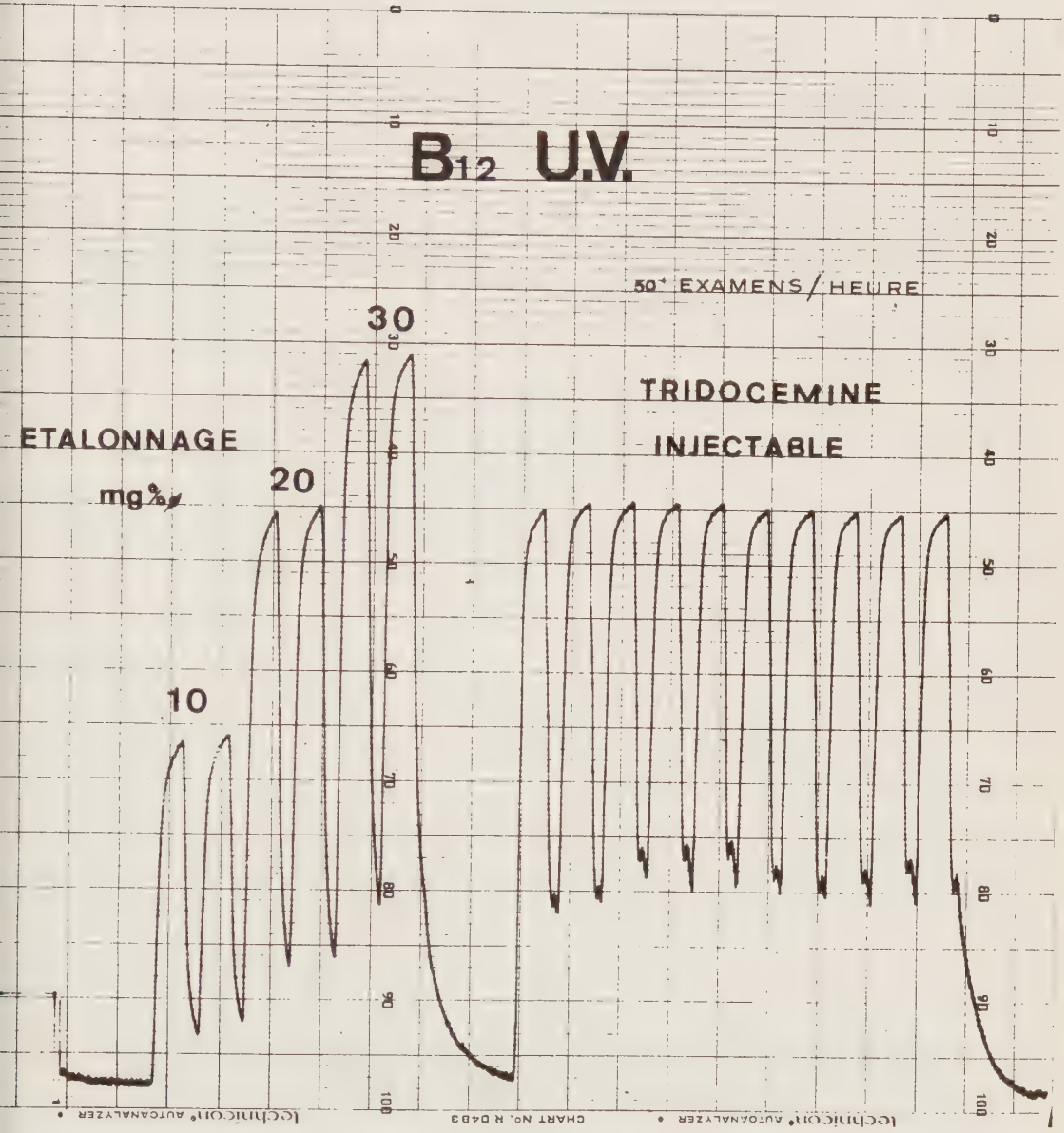


Figure n° 42 - Dosages automatiques de vitamine B_{12} (formes liquides)

Le montage utilisé réalise une dilution d'environ 1/10, ce qui donne des concentrations finales de 1, 1,5 , 2, 2,5 et 3mg% en vitamine B_{12} .

- Les différentes formes pharmaceutiques sont préparées de manière à obtenir des concentrations entrant dans la gamme d'étalonnage .

2°- Manifold :

Le schéma du manifold, extrêmement simple, est représenté sur la figure n°41 . L'échantillon est directement dilué dans de l'acide sulfurique N/10, et pénètre, après une bobine de mélange, au spectrophotomètre à 351 mμ dans le cas de la cyanocobalamine ou à 361mμ . pour l'hydroxocobalamine .

3°- Résultats

La figure n°42 montre dix enregistrements réalisés sur une préparation injectable lyophilisé de "Tridocémine" où la vitamine B_{12} se trouve sous forme de cyanocobalamine . Le contenu d'un flacon a été repris par 5ml d'acide sulfurique N/10 et mis directement en godet . La simplicité du montage permet une cadence de travail de 50 examens/heure avec un bon lavage entre deux échantillons et une bonne reproductibilité .

II - APPLICATIONS DE LA SPECTROPHOTOMETRIE U. V. au dosage des vitamines B_1, B_6 et B_{12} en voie automatique dans les formes solides .

Différentes formes solides ont été employées dans le cadre de cette expérimentation : comprimés, dragées, poudres, gélules .

A / DOSAGE DES VITAMINES B_1 et B_6

Comme nous l'avons vu précédemment, le dosage de la pyridoxine et de la thiamine s'effectuant dans des zones de concentrations tout à fait voisines, un montage commun peut être envisagé également dans le cas des formes solides .

1°- Matériel, Réactifs, Echantillonnages .

a) Matériel

Le même matériel que pour les formes liquides est nécessaire , mais ici le distributeur "Sampler II" doit être remplacé par un échantillonneur de solides : le "Solid Prep", dont le principe de fonctionnement a été décrit précédemment . D'autre part, il est recommandé d'utiliser , à la sortie du "Solid Prep" le filtre continu .

b) Réactifs

- Tampon pH = 7 décrit précédemment
- NaOH N/2
- Chlorhydrate de pyridoxine
- Chlorhydrate de thiamine

c) Echantillonnages

- Les solutions étalons habituellement utilisées sont remplacées ici par des étalons en poudre . Pour la vitamine B_6 , on utilise 50, 100, 150, 200, 250 et 300mg de chlorhydrate de pyridoxine . Pour la vitamine B_1 , les étalons sont fournis par les mêmes quantités de chlorhydrate de thiamine .

- Les formes médicamenteuses ne subissent aucun traitement préalable et sont mises directement en godet .

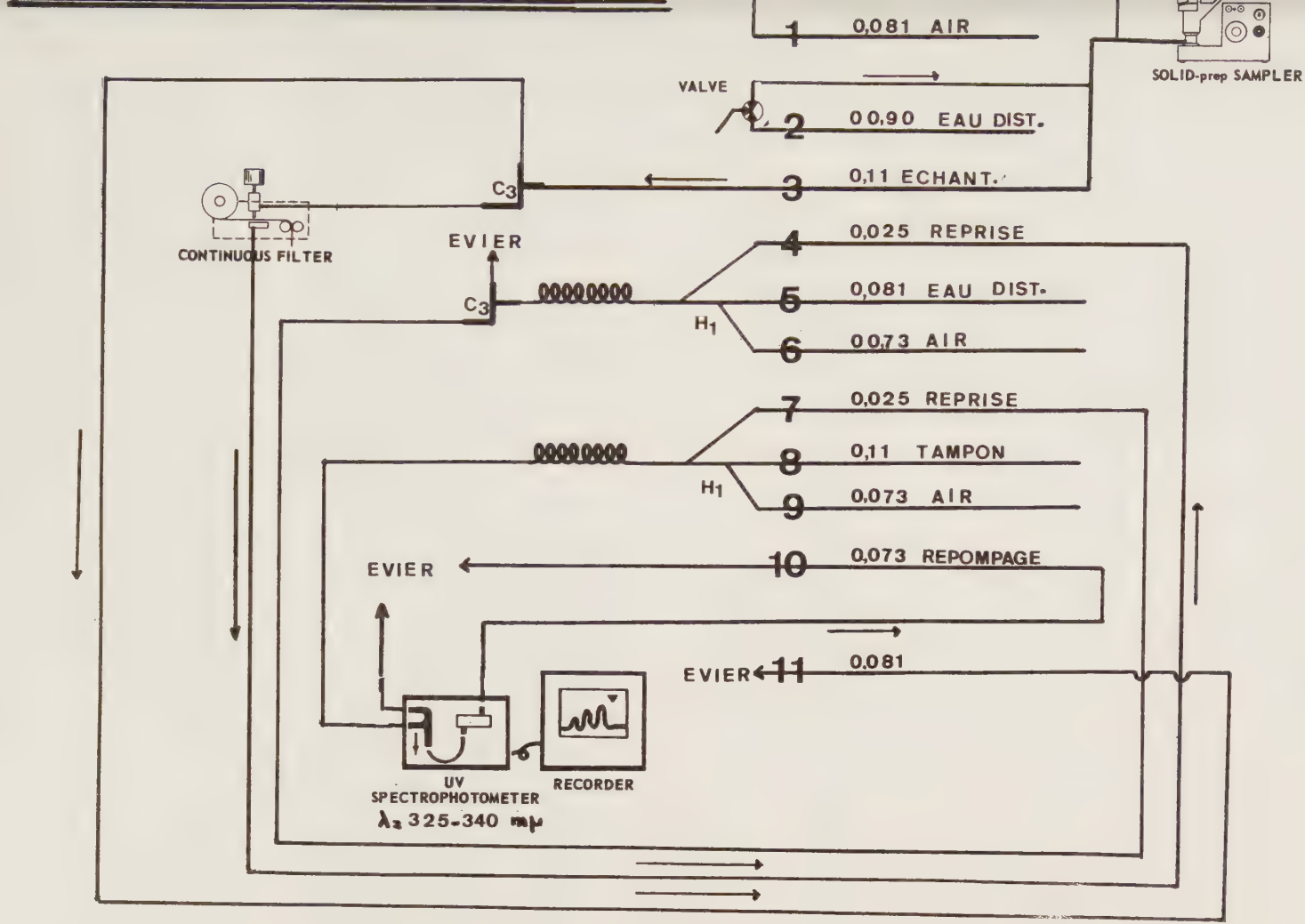


Figure n° 43 - Manifold pour le dosage UV de la vitamine B_1 et de la vitamine B_6 (formes solides)

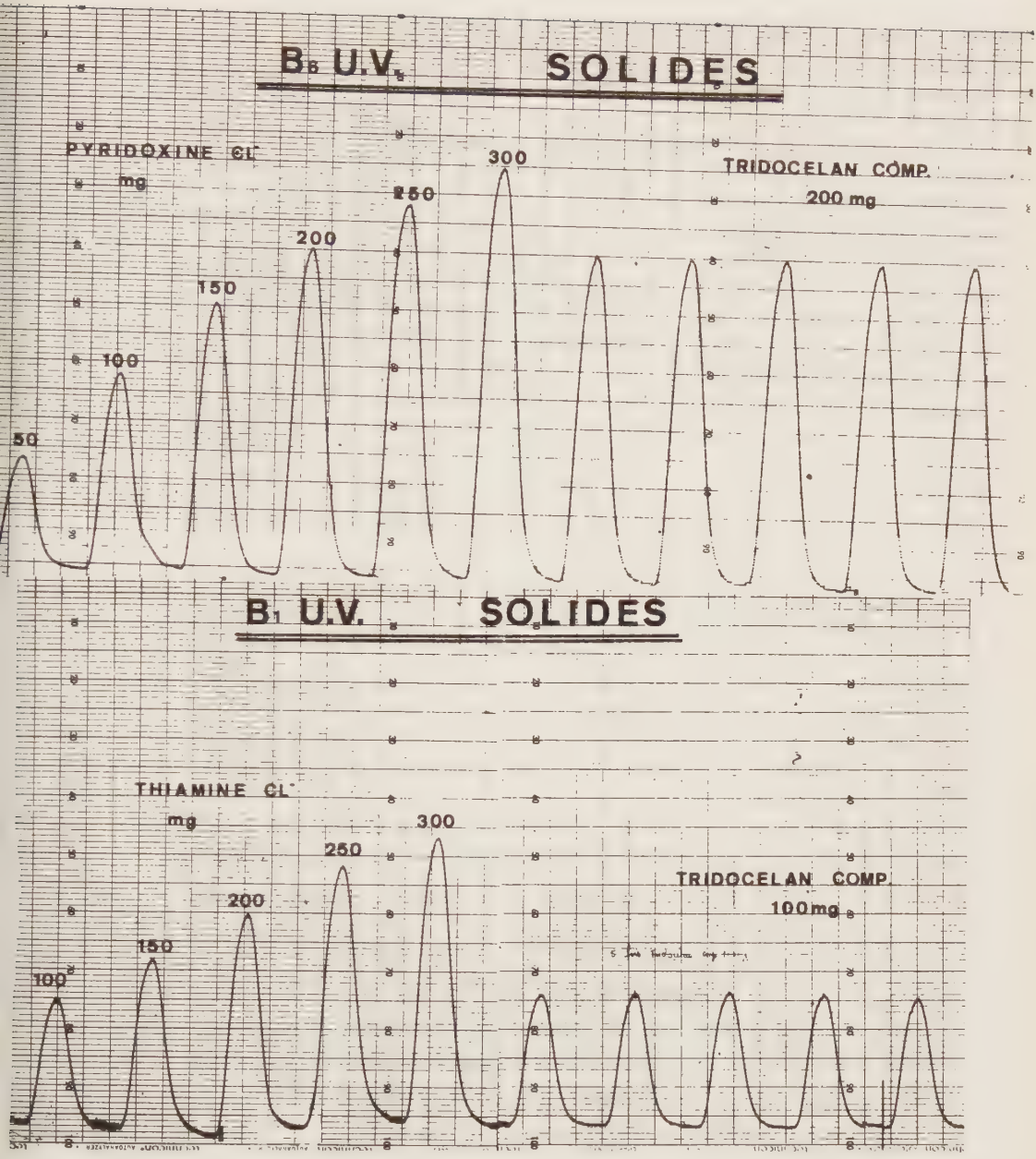


Figure n° 44 - Dosage automatique de vitamine B_1 et B_6 formes solides

2°- Manifold

Le schéma du manifold est représenté sur la figure n°43 . Comme on peut le voir, deux dilutions successives sont nécessaires pour se trouver dans les conditions de concentrations convenables . Le tube n° 8 est plongé dans le tampon de pH = 7 pour le dosage de la pyridoxine et dans la soude N/2 pour le dosage de la thiamine . Le volume du liquide de dissolution à introduire dans le "Solid Prep" a été fixé à 200 ml.

3°- Résultats

La figure n°44 représente un étalonnage et des enregistrements de comprimés contenant 100 mg de chlorhydrate de thiamine et 200mg de chlorhydrate de pyridoxine ainsi que de la vitamine B_{12} . Pour une vitesse réelle de 20 examens/heure , on peut voir sur ces enregistrements l'excellente reproductibilité d'un examen à l'autre .

4°- Remarques

Dans le but de contrôler les interférences possibles, dans le cas du dosage de la pyridoxine, on peut fort bien utiliser l'acide borique . Il suffit de réaliser une première série de dosages dans les conditions opératoires ordinaires, puis une deuxième série en plongeant le tube n°5 , assurant normalement la première dilution, dans une solution d'acide borique à 5g % ramené au même pH . En ce qui concerne les interférences possibles dans le dosage de la thiamine, on peut également utiliser dans une deuxième série de dosages, la soude N/200, comme nous l'avons vu précédemment .

On peut réaliser un montage unique permettant de doser simultanément ces deux vitamines sur un même échantillon . Il suffit pour cela de prélever à la sortie du filtre continu, deux aliquots dont l'un sera dilué dans le tampon de pH = 7 et l'autre dans la soude N/2 . Deux systèmes détecteurs sont évidemment nécessaires en sortie .

B / DOSAGE DE LA VITAMINE B_{12}

1°- Matériel, Réactifs, Echantillonnages .

a) Matériel :

Le même matériel auto technicon est nécessaire pour ce dosage . Signalons cependant que, si l'emploi du filtre continu ne s'impose pas pour le dosage de la pyridoxine et de la thiamine, il est ici absolument indispensable . En effet, le volume du liquide d'extraction introduit dans le "Solid Prep" est ici beaucoup plus réduit . La solubilisation de tous les principes des médicaments n'est pas toujours entièrement assurée : il est donc nécessaire d'éliminer toute trace de précipité qui empêcherait le dosage .

b) Réactifs

- Acide sulfurique 0,10 N : ce réactif est prélevé directement par le "Solid Prep" à raison de 50ml pour chaque échantillon .
- Cyanocobalamine
- Acétate d'hydroxocobalamine .

c) Echantillonnages

- Etalonnage

Il est fort difficile de réaliser un étalonnage à l'aide de poudres pré-pesées comme dans les cas précédents . En effet, la quantité de vitamine B_{12} habituellement rencontrée dans les spécialités pharmaceutiques est très faible, de l'ordre de 500 à 1000 microgrammes . On peut remédier à cet inconvénient en réalisant un étalonnage au moyen de solution étalons ainsi constituées :

B_{12} U.V. FORMES SOLIDES

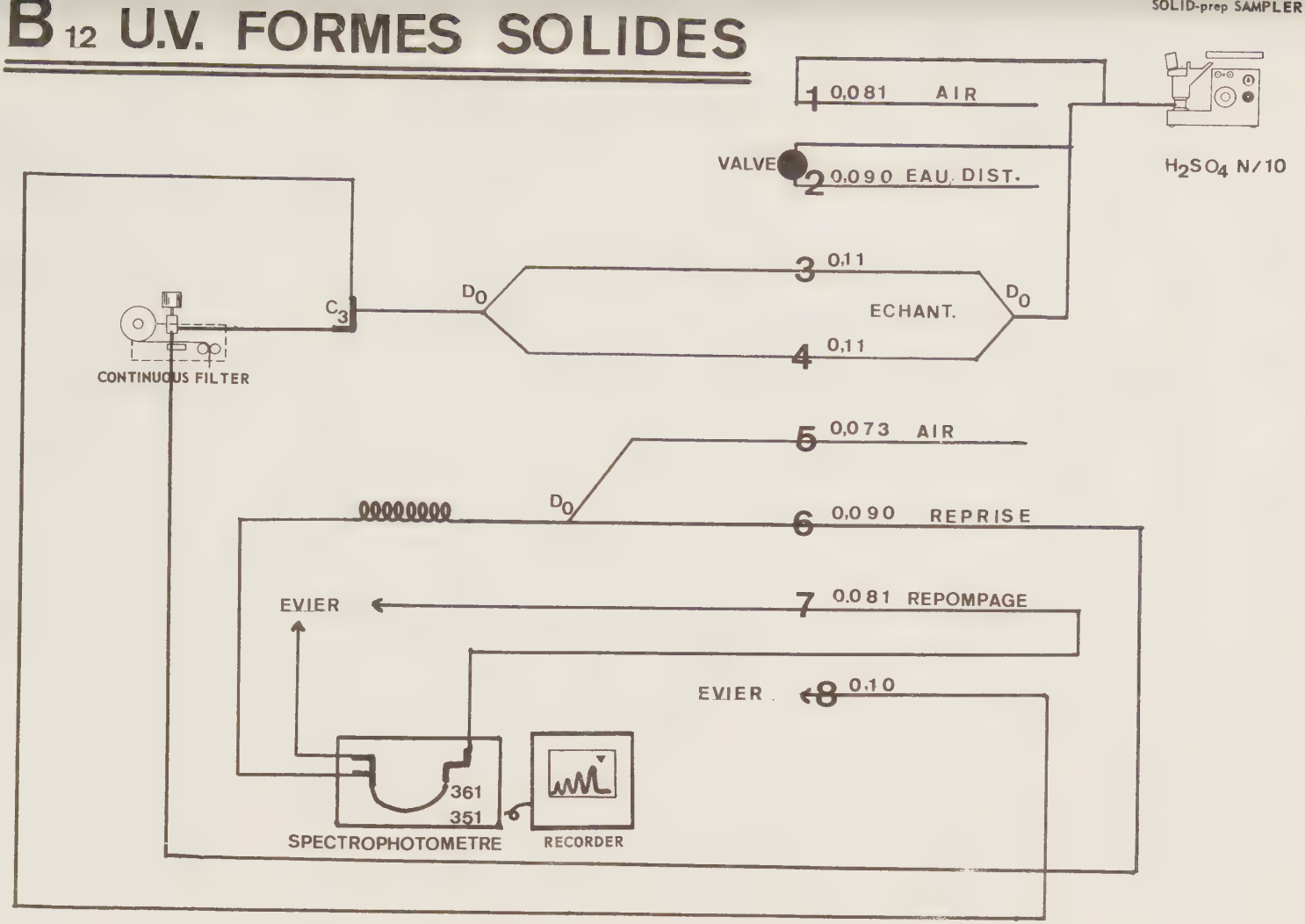


Figure n° 45 - Manifold pour dosage UV de la vitamine B_{12} (formes (formes solides)

Préparer une solution mère de cyanocobalamine ou d'acétate d'hydroxycobalamine à 100mg% . Dans trois godets du "Solid Prep" , introduire 0,50, 1 et 1,50ml de cette solution; cet étalonnage correspondra à 500, 1000, et 1500 microgrammes de vitamine B_{12} . Il y a lieu de tenir compte de ces faibles volumes dans le calcul final pour la détermination de la teneur en vitamine des solides dosés .

- Les différentes formes pharmaceutiques ne subissent aucun traitement préalable .

2°- Manifold

Le schéma , extrêmement simple, est représenté dans la figure n°45 . Ce montage représente une particularité par rapport à celui que nous avons déjà envisagé pour le dosage des vitamines B_1 et B_6 : en effet, les conditions de concentration interdisent toute dilution après la filtration, comme dans les cas précédents . Il faut donc , dans ces conditions, pouvoir reprendre à la sortie du filtre continu une quantité relativement importante de liquide pour l'envoyer directement, après l'avoir segmenté par de l'air, au spectrophotomètre . Or, les montages précédents ne permettent pas de prélever un volume assez important . C'est pourquoi, nous avons été amené à prélever à la sortie du "Solid Prep" le liquide au moyen de deux tubes d'un débit de 3, 90ml par minute . Dans ces conditions en réglant le déroulement du rouleau de papier filtre à vitesse minima, on peut après filtration repomper le liquide qui servira au dosage au moyen d'un tube de débit assez important : 2, 90ml/minute.

3°- Résultats

Des dosages réalisés sur des formes simples ou polyvitaminées ont donné des résultats tout à fait comparables à ceux obtenus pour les vitamines B_1 et B_6 . Signalons toutefois, qu'en raison de la faible sensibilité de la méthode, il est difficile d'envisager des dosages pour des spécialités contenant une quantité de vitamine B_{12} inférieure à 500 microgrammes par unité .

ETUDE COMPARATIVE SUR 8 LOTS DE BECILAN (PYRIDOXINE)

1 LOT DE PYRIDOSCORBINE (PYRIDOXINE + ACIDE ASCORBIQUE)

1 LOT DE TRIDOCELAN (PYRIDOXINE + THIAMINE + HYDROXOCOBALAMINE)

	BECILAN				PYRIDOSCORBINE				TRIDOCELAN			
	U V		D. C. Q. C.		U V		D. C. Q. C.		U V		D. C. Q. C.	
	MOYENNE	σ	MOYENNE	σ	MOYENNE	σ	MOYENNE	σ	MOYENNE	σ	MOYENNE	σ
LOT 1	101	0,70	100,45	0,60	101	1,02	100,60	0,60	99,80	0,40	99,40	0,70
LOT 2	102,15	1,04	103,10	0,90								
LOT 3	101,35	0,91	100,65	1								
LOT 4	100,40	0,97	101	0,95								
LOT 5	100,50	0,70	100,20	0,84								
LOT 6	101,35	0,60	101,10	0,90								
LOT 7	99,50	0,65	99,90	1,02								
LOT 8	100,50	0,28	100,80	0,70								

Figure n° 46 - Etude comparative de la méthode UV et de la méthode à la D.C.Q.C. (B_6)

Au terme de ce travail, il nous a paru intéressant de comparer dans le cas de la vitamine B_6 les résultats fournis par la méthode colorimétrique à la D. C. Q. C. à ceux obtenus par spectrophotométrie U. V. en voie auto-analytique . Huit lots de "Bécilan" injectable (pyridoxine), un lot de "Pyridoscorbine" (pyridoxine + acide ascorbique) et un lot de "Tridocélan " (pyridoxine + thiamine + hydroxocobalamine) ont été ainsi soumis à ces deux méthodes de dosages . Dans le cas de la pyridoscorbine le dosage colorimétrique a été réalisé en voie manuelle . Les résultats obtenus sont rassemblés dans la figure n°46 . Ils sont exprimés en pourcentage de principe par rapport à la valeur théorique. On note tout d'abord l'excellente corrélation qui existe entre les deux méthodes : les écarts-types ne sont jamais significatifs . On peut aussi remarquer que la moyenne des écarts types est plus faible pour la spectrophotométrie U. V. que pour la technique colorimétrique avec la dichloroquinone-chlorimide . De cette étude statistique, on peut tirer les conclusions suivantes :

1°- Sur le plan de la sensibilité et de la reproductibilité, les deux méthodes sont comparables .

2°- la méthode par spectrophotométrie ultraviolette lorsqu'elle est utilisable, c'est-à-dire en l'absence de vitamine A et B_2 en particulier, est la méthode de choix en raison de sa simplicité et de sa précision .

3°- Par contre, dans les associations polyvitaminées complexes, la méthode colorimétrique dont la spécificité est excellente grâce à l'utilisation d'un blanc à l'acide borique, nous semble seule utilisable .

CONCLUSIONS GENERALES

°°°

Dans ce travail, nous nous sommes intéressé à trois méthodes de dosage de la vitamine B_6 :

I - la réaction à l'acétate d'uranyle, méthode colorimétrique .

II - la réaction à la 2-6 dichloroquinone-chlorimide, méthode également colorimétrique .

III - la spectrophotométrie dans l'ultra-violet .

I - REACTION A L'ACETATE D'URANYLE :

L'étude expérimentale de la réaction à l'acétate d'uranyle nous a permis de préciser les conditions optima de réaction (temps, température, pH), les constantes d'absorption, le domaine d'application de la loi de Beer-Lambert, et les limites de sensibilité .

Nous avons étendu l'application de cette réaction aux chlorhydrate et citrate de pyridoxine .

Nous avons proposé une interprétation théorique du mécanisme de la réaction et plusieurs hypothèses sur la structure du complexe formé .

Dans l'application aux médicaments, nous avons discuté les limites de spécificité de cette réaction et proposé une méthode autoanalytique .

II - REACTION A LA 2-6-DICHLOROQUINONE - CHLORIMIDE :

L'influence de différents facteurs de la réaction à la 2-6-dichloroquinone-chlorimide a été envisagée :

- le pH est de beaucoup le facteur le plus important: il conditionne à la fois cinétique (vitesse et stabilité de la réaction) et sensibilité . Le tampon véronal-acétate de sodium acide chlorhydrique de pH = 7,60 fournit les meilleurs résultats .

- La concentration en 2-6-dichloroquinone-chlorimide du mélange réactionnel n'influence pas la cinétique de la réaction : elle sensibilise légèrement la réaction de coloration mais elle augmente paralèllement l'intensité du blanc réactif ; nous avons précisé le compromis qui nous a paru le plus favorable .

- la nature du solvant influence le spectre et la cinétique de la coloration ; elle intervient également dans la conservation du réactif : l'éthanol comme facteur de miscibilité dans le mélange réactionnel et le butanol comme solvant de la 2-6-dichloroquinone-chlorimide , nous paraissent les plus indiqués .

- une température voisine de 20° fournit les meilleurs résultats .

L'application de la réaction à 2-6-dichloroquinone chlorimide aux médicaments a posé deux problèmes .

a) la possible interférence de dérivés phénoliques non substitués en para .

b) l'inhibition de la réaction de coloration par la vitamine C .

- le premier problème peut être résolu par l'action complexante de l'acide borique dans des conditions que nous avons définies .

- le second problème a été solutionné par un procédé particulièrement simple : l'action de l'iode à froid .

Nous avons proposé deux techniques par voie autoanalytique :

- la première est destinée au dosage dans les formes liquides ,
- la seconde s'applique aux médicaments solides .

III - LA SPECTROPHOTOMETRIE DANS L'ULTRA-VIOLET :

L'étude expérimentale des spectres d'absorption dans l'ultra-violet des vitamines B_1, B_6 et B_{12} permet de distinguer :

- d'une part les vitamines B_1 et B_6 qui sont fortement influencées par le facteur pH .
- d'autre part, les vitamines B_{12} (cyanocobalamine et hydroxocobalamine) dont l'absorption est indépendante de ce même facteur .

Sur le plan analytique il en résulte que par le jeu du facteur pH,on peut doser chacune de ces trois vitamines dans un mélange .

Dans l'application aux médicaments, les interférences éventuelles sont éliminées :

- dans le cas de la vitamine B_1 en jouant sur l'instabilité de ce composé en milieu alcalin .
- dans le cas de la vitamine B_6 au moyen du complexe borique .

Nous avons contrôlé en voie manuelle :

- des formes simples (B_6) : suppositoires, ampoules, sirop, comprimés .

- des formes polyvitaminées (comprimés, ampoules) associant les vitamines B_1 , B_6 et B_{12} et même la vitamine C .

Nous avons proposé des méthodes autoanalytiques adaptées aux dosages dans les formes liquides et dans les formes solides de ces trois vitamines .

Les méthodes automatiques présentent d'indiscutables avantages sur les méthodes manuelles .

BIBLIOGRAPHIE

1- ANDERSON (F. J.) and MARTIEL (A. E.) J. Amer. Chem. Soc., 1964, 86, 715 .

2- ATKIN (L.), SCHULTZ (A. S.), WILLIAMS (W. L.) and FREY (C. N.)
Anal. Chem., 1943, 15, 141 .

3- AUERBACH (M. E.)
J. Amer. Pharm. Assn. 1940, 29, 313-16 .

4- BALLARD (C. N.) and BALLARD (E. J.)
J. Pharm. Pharmacol., 1949, 1 , 330-3 .

5- BANDELIN (F. J.) and TUSCHHOFF (J.) Analytic Chem., 1953, 25, 1198 .

6- BAUR (E.) et REBMANN (A.) -
Helv. Chim. Acta, 1922, 5 , 221-239 .

7- BESSOT (M. L.)
J. Pharm. Chim., 1940, Ser. 9, 1, 281 .

8- BEYER (Wm.) , UPJOHN (Co), KALAMAZOO (K.)
Priv. Comm. Mich.

9- BIRD (O. D.), VANDELBELT (J. M.) and EMMET (A. D.) . J. Biol. Chem., 1942, 142, 317-22 .

10- BOESENKEN (J.) Rec. Trav. Chim. Pays Bas, 1921, 40 , 553, 568, 578 .

11- BOXER (G. E.) and RICKARDS (J. C.) .
Arch. Biochem., 1951, 30 , 372-392 .

12 - BRITTON (J.) et ROBINSON (F.) .
J. Chem. Soc. 1931, p. 1456 .

13- BROWN (E. B.), BINA (A. F.) and THOMAS (J. M.)
J. Biol. Chem., 1945, 158, 455 .

14- BURGER (K.) - Talanta, 1963, 10, 573-582 .

15- BURKHOLDER (W. J.) and Al.
J. Bacteriol., 1944, 48, 385 .

16- CARPENTER (L. E.) and STRONG (F. M.) .
Arch. Biochem., 1944, 3, 375 .

17- CHOLVY (S.) Ann. Pharm. Franç., 1960, 18, n°3, 138-144 .

18- CLAUSEN (D. F.) and BROWN (R. E.) .
Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 1944, 16, 672-4 .

19- COON (J. B.), NORMAN SARA (L.) and WARTMAN (J. G.) - Science, 1951, 113, 658-9 .

20- DELLWEG (H.) and BERNKAUER (K.) .
Biochem. Z., 1956, 328, 264 .

21- DOHERTY (J. J.), CANE (N.) and WOKES (F.) .
J. Pharm. Pharmacol., 1955, 7, 1053 .

22- DONY (J.) and CONTER (J.) .
J. Pharm. Belg., 1956, 11, 186 .

23- DOWD (N.), KILLARD (A.), PAZRERA (J.) and FERRARI (A.)
Ann of the New-York Academy of science, 1965, 130, Art. 2, 558-567 .

24- ELDVIDGE (D. A.) and PEUTRELL (B.) .
J. Pharm. Pharmacol., 1961, 111 T, Suppl. 13 .

25- FORD (J. E.),
Brit. J. Nutrit., 1958, 229, 7

26- FORSTER (J. S.), MURFIN (J. W.) .
J. Pharm. Pharmacol., 1961, 13, 126 T - 132 T .

27- GARAT (D. C.) quantitative analysis of drugs, 1964, 38, 47 .

28- GAUDIANO (A.), POLIZZI-SCIARRONE (M.),
Ann. Ist. Super. Sanita, 1965, 1, 588-602 .

29- GIBBS (H. D.), J. Physic. Chem., 1927, 31, 1053 .

30- GIBBS (H. D.) , J. Biol. Chem., 1927, 72, 649 .

31- GLASS (G. B. J.), SKEGGS (H. R.) , LEE (D. H.) , JONES (E. L.) and HARDY (W. W.) Nature, London 1961, 189, 138 .

32- GUIMARAES VILLELA (G.) and ALVISION (M.) Science, 1939, 90, 179 .

33- GREENE (R. D.) , J. Biol. Chem., 1939, 130, 513 .

34- HARRIS (S. A.), WEBB (T. J.) and FOLKERS (K.) An. Chem. Soc., 1940, 62, 3198 .

35- HAYDEN (K. J.) - Pharmaceutical Analysis, 1957 , p. 658-659 .

36- HEYL (D.), LUZ (E.) HARRIS (S. A.) and FOLKERS (K.) . J. Ann. Chem. Soc. 1951, 73, 3430 .

37- HOCHBERG (M.), MELNICK (D.) and OSER -(B. L.) - J. of Biol. Chem., 1944, 155, 129-136 .

38- HOCHBERG (M.), MELNICK (D.) and OSER (B. L.)- J. Biol. Chem.1944 , 155, 119-128 .

39- HOCHBERG (M.), MELNICK (D.) and OSER (B. L.) J. Biol. Chem.1944 , 155, 109-119 .

40- HOKBERNSTROM (B.) - Acta Chem. Scand., 1956, 10, 163-173 .

41- HUTNER (S. H.) et al. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1949, 70, 118 .

42- JANSEN (B. C. P.) - Recueil Trav. Chim. Pays bas, 1936, 55, 1046 .

43- KATZ (J. J.) et SEABORG (G. T.) - The Chemistry of the activid elements, 1957, p. 463 London .

44- KERNY (P. H.), BILLON (J. P.) - An. Pharm. Franç., 1959 .

45- KHOURY (A.), CA LI (L.) -
Autom. Analytic . Chem. Technicon Symposia, 1965, 22-26 .

46- KHOURY (A.) - Technicon Controls, Research Park Ardsly, N Y Internal Report .

47- KHOURY (A.) , Wyeth Labs. Inc., Radnor Pa , Product Develop. Sect. Internal Report .

48- KIRST (E. R.) and BER GEIM (O.) -
J. Biol. Chem., 1942, 143, 575-88 .

49- KLOTZ (T. A.) et coll. -
Pharmazeutishe Zentralhalle, 1964, 103, 169-180 .

50- KUNH (R.) and LOW (I.) - Ber Chem. Ges., 1939, 72, 1453 .

51- LAUBIE (H.) -
Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 1949, 87, 119.

52- LHOEST (W.) -
J. de Pharmacie de Belgique, 1956, 11, 495-531 .

53- LINKSWILLER (H.), REYNOLDS (M. S.) -
J. Nutr., 1950, 41, 523 .

54- LODI (M.) - Chimica e Industria (Milan) - 1945 , 27, 80-2 .

55- LOISELEUR (J.) - Techniques de Laboratoires . Masson Edit., 1954, 1, 20

56- MARENZI (A. D.) -
Anales Farm. Bioquinn (Buenos Aires) 1940, 11, 115-8 .

57- MICHAELIS (L.) -
Biochem. Z., 1931, 234, 139 .

58- MULLER (J.) -
Cheva Ztg., 1919, 43, 739-740 .

59- ORMSBY (A. A.), FISHER (A.) and SCHLENK (B.)
Arch. Bioch., 1947, 12, 79-81 .

60- OSTET-CONTER (J.) -
An. Farm. Hospital , 1967, 10, n°20-45-75.

61- PANSHINA - TRUFANOVA (I.) -
Biokkimaga, 1936, 1, 597-602 .

62- PASCAL (P.) -
Nouveau Traité de chimie minérale, Tome 1, p. 142 et 164 .

63- PELLERIN (F.), GAUTIER (J. A.,) DEMAY (A.),
An. Pharm. Franç., 1966, 24, n°11, 675-680 .

64- PHARMACOPEE RUSSE , 1961, 53-54 .

65- PIFFER (W.), WOLLISH (E. G.),
J. of Amer. Pharm. Assoc., 1951, 40, 609-612 .

66- PLETICHA (R.) -
Pharmazie, 1957, 12, 219 .

67- RANSY (J.) -
J. de Pharmacie de Belgique, 1952, 5-6 , 224-229 .

68- RAYBIN (H. W.) - Science , 1938, 88, 35 .

69- SARRET (H. P.) and CHEDELIN (V. H.) -
J. Biol. Chem., 1944, 155, 153 .

70- SCUDI (J. V.), UNNA (K.) and ANTOPOL (W. J.) -
J. Biol. Chem., 1940, 135, 371 .

71- SCUDI (J. V.), BASTEDO (W. A.) and WEBB (T. J.),
J. Biol. Chem., 1940, 136, 299 .

72- SCUDI (J. V.) -
J. Biol. Chem., 1941, 139, 707 .

73- SCUDI (J. V.) -
J. Biol. Chem., 1942, 145, 637 .

74- SHAH (R. C.) , RAMAN (P. T.) and SHAH (B. M.) -
J. Pharm. Sciences, 1963, 52, 167 .

75- SHAH (R. C.), RAMAN (P. T.), MEHTA (M. M.) -
J. Pharm. Sciences , 1965, 3, 432-436 .

76- STEINER (C.) et LEPIERE (C.) -
J. Pharm. de Belgique , 1956, 11, 3-4, 191-9 .

77- STEJSKAL (Z.) -
Zeistschrift für analytishe chimie , 1958, 163-234 .

78- STILLER (E. T.) et KEREZSZTESY (J. C.) et STEVENS (J. R.) -
J. Amer. Chem. Soc., 1939, 61, 1237 .

79- STOCK (F. G.) -
Analyst., 1950, 75, 499 .

80- SWAMINATHAN (M.) - Nature, 1940, 145, 780 .

81- SWAMINATHAN (M.) -
Indian J. Med. Res., 1941, 29, 561 .

82- TARDIFF (R.) -
J. Pharm. Sciences, 1961, 50, 693 .

83- TEERI (A. E.) -
Chemist. Analyst., 1952, 41, 62 .

84- TERRI (A. E.) -
J. Biol. Chem., 1952, 196, 547-50 .

85- THOMPSON (H. T.) et al. -
J. Biol. Chem., 1950, 184, 175 .

86- TSUDA (T.), YAMAMOTO (T.) , YARIMIZU (S.) -
Ann Sankyo . Res. Lab., 1964 , 16, 109-118 .

87- UNITED STATES PHARMACOPEIA -
17ème Ed., 1965, 888-9 .

88- UTIGER (R.) -
Bull. Soc. Chim. Biol., 1949, 31, 238-249 .

89- WILLIAMS (H.) and WOKES (F.) -
Quart. J. Pharm. Pharmacol., 1947, 20, 240-57.

90- WILLSTAED (H.) and BARANY (F.) -
Enzymologia 1938, 2, 316-320.

INDEX DES FIGURES

°°°°

I - REACTION A L'ACETATE D'URANYLE

Figure n°1 : A = f (λ) . Spectre d'absorption .

Figure n°2 : A = f (T) . Facteur Temps .

Figure n°3 : A = f (Θ°) . Facteur température .

Figure n°4 : A = f (pH) . Tampon phtalate acide-phtalate neutre de potassium .

Figure n°5 : A = f (pH) . Tampon acide acétique-acétate de sodium .

Figure n°6 : A = f (pH) . Tampon acide acétique-acétate de sodium .

Figure n°7 : Loi de Beer : pyridoxine base .

Figure n°8 : Loi de Beer : chlorhydrate de pyridoxine .

Figure n°9 : Loi de Beer : citrate monopyridoxinique .

Figure n°10 : Manifold .

Figure n°11 : Dosages automatiques de la vitamine B_6

II - REACTION A LA 2-DICHLOROQUINONE-CHLORIMIDE .

Figure n°12 : A = f (λ) . Spectre d'absorption .

Figure n°13 : A = f (pH) . Tampon véronal-acétate de sodium -HCL .

Figure n°14 : A = f (pH) et f (T). Tampon véronal-acétate de sodium-HCL.

Figure n°15 : A = f (pH). Tampon boro-acéto-phosphorique.

Figure n°16 : A = f (T). Cinétiques comparées de deux réactions en tampon véronal et en tampon de Britton et Robinson .

Figure n°17 : A = f (D. C. Q. C.) Influence de la concentration en D. C. Q. C.

Figure n°18 : Spectres des blancs réactifs .

Figure n°19 : Influence du solvant .

Figure n°20 : A = f (C) . Loi de Beer .

Figure n°21 : Oxydation de la vitamine C par l'iode .

Figure n°22 : Oxydation de la vitamine C par des quantités croissantes d'iode .

Figure n°23 : Manifold pour les formes liquides .

Figure n°24 : Dosages automatiques de formes liquides . 40 examens/heure .

Figure n°25 : Dosages automatiques de formes liquides . Différentes vitesses .

Figure n°26 : Enregistrements réalisés sur le "Bécozyme sirop" .

Figure n°27 : Solid Prep et Filtre continu .

Figure n°28 : Manifold pour les formes solides .

Figure n°29 : Dosages automatiques de formes solides .

III - SPECTROPHOTOMETRIE DANS L'ULTRA-VIOLET

Figure n°30 : A = f (pH) . Vitamine B_1 .

Figure n°31 : Instabilité de la thiamine en milieu alcalin .

Figure n°32 : A = f (pH). Vitamine B_6 .

Figure n°33 : A = f (pH) . Cyanocobalamine .

Figure n°34 : A = f (C). Loi de Beer - (B_6).

Figure n°35 : Composition des différentes spécialités étudiées (B_6) .

Figure n°36 : Dosages de vitamine B_6 .

Figure n°37 : Dosages de vitamine B_{12} .

Figure n°38 : Manifold commun aux dosages des vitamines B_1 et B_6 (liquides) .

Figure n°39 : Dosages automatiques de formes liquides (B_1 et B_6) .

Figure n°40 : Résultats des dosages automatiques de huit lots de Bécilan (B_6) .

Figure n°41 : Manifold pour le dosage de la vitamine B_{12} (formes liquides) .

Figure n°42 : Dosages automatiques de formes liquides (B_{12}) .

Figure n°43 : Manifold commun au dosage des vitamines B_1 et B_6 (Solides) .

Figure n°44 : Dosages automatiques de formes solides (B_1 et B_6) .

Figure n° 45 : Manifold pour le dosage de la vitamine B_{12} (formes solides)

Figure n°46 : Etude comparative de la méthode à la D. C. Q. C. et de la méthode U. V. (Vitamine B_6) .

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION 1

PREMIERE PARTIE : Réaction à l'acétate d'uranyle 5

Chapitre I - Etude expérimentale de la réaction 7

A / Matériel, Réactifs, Protocole expérimental .. 7
1- Matériel 7
2- Réactifs 7
3- Protocole expérimental 8

B / Etude expérimentale proprement dite 9

C / Discussion des résultats 9
1- Spectre d'absorption 9
2- Facteur temps 10
3- Facteur température 10
4- Facteur pH 10
a) Etude au moyen du système phtalate acide/phtalate neutre de potassium 10
b) Etude au moyen du système acide acétique-acétate de sodium 10
5- Facteur photochimique 16
6- Vérification de la loi de Beer-Lambert 16
7- Extension de la réaction au chlorhydrate et au citrate de pyridoxine 18
8- Mécanisme de la réaction-Structure du complexe coloré 18

Chapitre II - Application de la réaction au dosage de la pyridoxine dans les médicaments 23

A / Voie manuelle 23

B / Voie automatique 25

Pages

1- Matériel 25
2- Réactifs 25
3- Manifold 26
4- Résultats 29

DEUXIEME PARTIE - Réaction à la 2-6 dichloro-quinone chlorimide 30

Chapitre I - Etude expérimentale de la réaction 34

A / Matériel, Réactifs, Protocole expérimental 34
1- Matériel 34
2- Réactifs 34
3- Protocole expérimental 35

B / Etude expérimentale proprement dite 36

C / Discussion des résultats 40
1- Spectre d'absorption 40
2- Influence du pH 40
a) Système Véronal-Acétate de sodium ..... HCL 40
b) Système boro-acéto-phosphorique 44
3- Etude de la concentration en 2-6-dichloro-quinone-chlorimide 46
4- Etude des différents solvants de la réaction 48
5- Etude de l'influence de la température 50
6- Vérification de la loi de Beer-Lambert 52

Chapitre II - Applications aux médicaments : spécificité-interférences 54

A / Etude des fausses réactions positives éventuelles 54

B / Moyens de contrôle des interférences : utilisation du complexe borique 56

C / Etude des fausses réactions négatives (inhibitions) 60

D / Oxydation de la vitamine C par l'iode 61

Pages

Chapitre III - Applications aux médicaments
Méthodes automatiques 69

I- Dosage de la pyridoxine dans les formes médicamenteuses liquides 69

A / Matériel, Réactifs, Echantillonnage 69
1- Matériel 69
2- Réactifs 69
3- Echantillonnage 69

B / Manifold 75

C / Résultats 75

D / Remarques .....

II- Dosage de la pyridoxine dans les formes médicamenteuses solides 79

A / Matériel, Réactifs, Echantillonnage 79
1- Matériel 79
2- Réactifs 79
3- Echantillonnage 79

B / Manifold 84

C / Résultats 84

D / Remarques 84

TROISIEME PARTIE - Spectrophotométrie U. V. des vitamines B_1 , B_6 et B_{12} 86

Chapitre I - Rappel des différentes méthodes des vitamines B_1, B_6 et B_{12} 88

A / Vitamine B_1 88
a) Méthodes gravimétriques 88
b) Méthode polarographique 88
c) Méthodes colorimétriques 88
d) Méthode fluorométrique 89

B / Vitamine B_6 90

Pages

C / Vitamine B_{12} 90
- Méthodes colorimétriques 90
- Méthode fluorométrique 90

Chapitre II - Etude expérimentale des spectre U. V. des vitamines B_1, B_6 et B_{12} 91

A / Matériel, Réactifs, Protocole expérimental .. 91
1- Matériel 91
2- Réactifs 91
3- Protocole expérimental 94

B / Influence du pH sur les spectres d'absorption 94
1- Vitamine B_1 95
2- Vitamine B_6 99
3- Vitamine B_{12} 104

C / Loi de Beer-Lambert 104

Chapitre III - Intérêt analytique de la spectrophotométrie U. V. 105

A / Dosage de la thiamine 106

B / Dosage de la pyridoxine 107

C / Dosage de la vitamine B_{12} 108

Chapitre IV - Applications de la spectrophotométrie U. V. au dosage des vitamines B_1, B_6 et B_{12} dans les médicaments : méthodes manuelles 109

I - Rappel des travaux antérieurs 109

II - Contribution personnelle 112
Dosage de la vitamine B6 112

A / Matériel, Réactifs, Protocole expérimental
1- Matériel 112
2- Réactifs 112
3- Protocole expérimental 114

Pages

B / Résultats 116

Dosage de la vitamine B_1 117

Dosage de la vitamine B_{12} 117

A / Méthodes, réactifs, protocole expérimental 117

B / Résultats 119

Chapitre V - Applications de la spectrophotométrie U. V. au dosage des vitamines B_1, B_6 et B_{12} dans les médicaments : méthodes automatiques 120

I - Méthodes automatiques adaptées au contrôle des des formes liquides ou des formes solides mises en solution 120

A / Dosage de la vitamine B_1 et de la vitamine B_6 121

1- Matériel, réactifs, échantillonnages 121

2- Manifold 122

3- Résultats et discussion 122

B / Dosage de la vitamine B_{12} 128

1- Matériel, réactifs, protocole expérimental .. 128

2- Manifold 131

3- Résultats 131

II- Méthodes adaptées au contrôle des formes solides 131

A / Dosage des vitamines B_1 et B_6 132

1- Matériel, réactifs, échantillonnages 132

2- Manifold 135

3- Résultats 135

4- Remarques 135

Pages

B / Dosage de la vitamine B_{12} 136
1- Matériel, réactifs, échantillonnages 136
2- Manifold 138
3- Résultats 138

Conclusions générales 141

Bibliographie 146

Index des figures 152

Vu,
Le Doyen :
F. TAYEAU

Bon à imprimer,
Le Président de Thèse :
R. CROCKETT

Vu et permis d'imprimer,
Bordeaux, le 3 décembre 1968
Le Recteur de l'Université :
J. BABIN

EDITIONS BERGERET
2, rue Bergeret
BORDEAUX

Tél. 91.12.59